

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I**



**RELACIONES ESTRUCTURA-FUNCIÓN DEL SISTEMA  
SURFACTANTE PULMONAR : DETECCIÓN DE  
COMPLEJOS MULTIPROTEICOS NATIVOS Y  
PARTICIPACIÓN DEL SURFACTANTE EN LA DIFUSIÓN  
INTERFACIAL DE OXÍGENO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Bárbara Olmeda Lozano**

Bajo la dirección de los doctores  
Jesús Pérez Gil,  
Antonio Cruz Rodríguez

**Madrid, 2011**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Dpto. de BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I**



**RELACIONES ESTRUCTURA-FUNCIÓN DEL SISTEMA  
SURFACTANTE PULMONAR: DETECCIÓN DE COMPLEJOS  
MULTIPROTEICOS NATIVOS Y PARTICIPACIÓN DEL SURFACTANTE  
EN LA DIFUSIÓN INTERFACIAL DE OXÍGENO.**

TESIS DOCTORAL

por

**BÁRBARA OLMEDA LOZANO**

Directores: **Dr. Jesús Pérez Gil**

**Dr. Antonio Cruz Rodríguez**

Madrid, 2011

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Dpto. de BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I**



**RELACIONES ESTRUCTURA-FUNCIÓN DEL SISTEMA  
SURFACTANTE PULMONAR: DETECCIÓN DE COMPLEJOS  
MULTIPROTEICOS NATIVOS Y PARTICIPACIÓN DEL SURFACTANTE  
EN LA DIFUSIÓN INTERFACIAL DE OXÍGENO.**

TESIS DOCTORAL

por

**BÁRBARA OLMEDA LOZANO**

Directores: **Dr. Jesús Pérez Gil**

**Dr. Antonio Cruz Rodríguez**

Madrid, 2011





*La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular I de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección del Dr. Jesús Pérez Gil y el Dr. Antonio Cruz Rodríguez. Parte de los experimentos fueron llevados a cabo en la Universidad Estatal de Pensilvania (Estados Unidos), en colaboración con la Dra. Joanna Floros y el Dr. David Phelps.*



*A mis padres Bárbara y Modesto,  
a mis abuelos Emilio y Leonor,  
a Manuel.*



## **AGRADECIMIENTOS**

*En primer lugar quiero agradecer a mi director de Tesis, el Prof. Jesús Pérez-Gil, la oportunidad que me dio hace años de poder trabajar en un buen grupo de investigación como el que él ha creado, no conozco a muchas personas con tanta capacidad de trabajo y para abordar tantas cosas a la vez. Al terminar la carrera me dijo que le llamara si necesitaba algo y así fue, le llamé y me reclutó para formar parte del mundo del surfactante pulmonar. También en esos primeros días me habló de las Tesis que apuestan por temas arriesgados, en las que la dificultad vale la pena por la satisfacción de haber hecho un buen trabajo. Por ello también gracias por tu confianza en mí, ya que aunque haya costado más de lo que pensábamos, finalmente aquí está el resultado del esfuerzo de todos esos años.*

*En segundo lugar agradezco también a mi codirector, el Prof. Antonio Cruz, la disponibilidad que siempre ha mostrado a ayudar y a aportar ideas. Gracias “profe”, todos los que pasamos por este grupo agradecemos tenerte ahí.*

*Durante todo este tiempo he tenido el placer de colaborar científicamente con mucha gente tanto dentro como fuera de nuestro laboratorio. Empezaré con todos aquellos que me han acogido, unos días, o unos meses, en sus grupos. En primer lugar me gustaría agradecer enormemente al grupo de la Dra. Joanna Floros, de Hershey, la acogida que me brindaron durante mi estancia allí, y muy especialmente a la Dra. Patricia Silveyra, que además de maestra en el laboratorio fue y sigue siendo una amiga. Igualmente agradezco al grupo del Dr. David Phelps su ayuda durante ese mismo tiempo, en especial al Dr. Todd Umstead, que incluso tuvo que perderse un mitin en plenas elecciones presidenciales para ayudarme con el DIGE. Gracias a Joanna y a David por hacerme sentir tan a gusto en sus laboratorios y por compartir conmigo hasta el pavo de Acción de Gracias.*

*En segundo lugar estoy especialmente agradecida al grupo del Dr. José López Barneo, de Sevilla, por acogerme en numerosas ocasiones y estar siempre dispuestos a ayudarme. Muchísimas gracias al Dr. Alberto Pascual, por tratarme tan bien y por realizar las operaciones de las ratas. Gracias también a Tere, por recibirme siempre con los brazos abiertos y enseñarme esa preciosa ciudad.*

*También quiero agradecer muy especialmente su colaboración al Dr. Guillermo Orellana, por sus ideas y su ayuda imprescindible ya desde hace años para el estudio de la difusión de oxígeno. Gracias también a Laura Villén. Agradezco igualmente al Dr. Manuel Gómez, del INTA, su inestimable ayuda en el desarrollo del modelo de SP-B. En dos ocasiones tuve también la oportunidad de trabajar con el grupo del Dr. Antonio Enríquez, primero en Zaragoza y luego en Madrid. Gracias Toño, Patricio y Ester, por recibirme y ayudarme con las Blue Native. Finalmente gracias a todos los que, de algún modo u otro, han colaborado en mi vida científica en algún momento durante estos años: al Dr. Matthias Ochs y al Dr. Dimitri Vanhecke de Berna, al Dr. Oscar Llorca y al Dr. Germán Rivas del CIB, y al Dr. Luis Vázquez del Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid.*

*Han sido muchísimos los que han entrado y salido del laboratorio durante estos años. Gracias a todo mi grupo, los que estáis y los que ya os fuisteis: especialmente al Dr. Jorge Bernardino, mi primer contacto con el mundo del surfactante; a las Dras. Inés Plasencia y Alicia González; a la Dra. Azucena González con la que pasé mucho tiempo en el laboratorio, gracias por tener siempre tanta confianza en mí y darme tantos ánimos; a la Dra. Alicia Palacios (Ali II) por tener siempre una sonrisa preparada; a mi grupo actual: Mer, Olga Lucía, Elena, Alex, Odalys, Vicky y Vir (aunque hayas sido la última en llegar da gusto tenerte en el laboratorio). Me gustaría agradecer en especial a la Dra. Begoña García (y también a Pablo); Bego gracias por todo, espero que tu vida en el grupo sea genial y que podamos compartir más tiempo juntas en la poyata. No puedo olvidarme por supuesto de las L7 del grupo: la Dra. Pilar Estrada y Ángeles. Muchas gracias Pilar por tratarme siempre tan bien en tu laboratorio todos estos años. Gracias Ángeles por tus ánimos, sobre todo en estos últimos tiempos, mucha suerte en tu último tramo, ¡eres la siguiente!*

*Compartir un laboratorio con tanta gente no es siempre fácil, en especial cuando se trata de compartirlo con otro grupo de investigación. No obstante para mí nunca ha sido un problema y he de agradecer a la Dra. Cristina Casals el buen trato que siempre he recibido por su parte y por soportar mis risas que inevitablemente habrá oído desde su despacho en más de una ocasión... También a su grupo, con el que he compartido tantos momentos: Olga, Fer, Chami, Juanma, Carlos. Gracias a Belén, Carmen y Vir por compartir conmigo más que el laboratorio, por vuestra alegría y amistad. También gracias a toda la gente del departamento con los que he compartido tantas cosas durante todos estos años, por las comidas tan entretenidas y por tener siempre una sonrisa preparada por el pasillo: a los L3, a los L5 y también a Tere y Regina, a Carmen y a Julia. En especial quiero mencionar a un amigo, Jumi, se te echa mucho de menos.*

*Creo que es necesario un apartado nuevo para agradecer a unas personas que han sido mucho más que compañeras durante tantos años. Eli P, eres una persona especial que se hace querer, gracias por tu sentido del humor único y por tu dulzura. Jana, gracias por compartir tantas cosas conmigo y estar siempre preparada para escucharme y darme tu apoyo. Eli J, gracias por apoyarme tanto y por ser como eres, te mereces todo lo mejor. Almu, no puedo decirte nada que no te haya dicho ya. Juntas hemos vivido de todo, bueno y malo; gracias por reír y llorar a mi lado, por escucharme, animarme, aconsejarme, por ser sabia-almu, por darme lo que más quiero, pero sobre todo por ser mi amiga.*

*Gracias a Gema, Almu, Cris, Evita. Ruth, María, Irene, Janeth y Evelynne, y también a Alfredo, Patri y Gil, por haberme aguantado tantas conversaciones sobre mi trabajo, a veces sin entender muy bien de qué va eso del mundo de la ciencia.*

*Finalmente sólo me queda agradecer y dedicar esta Tesis a las personas más importantes de mi vida, gracias a las cuales he llegado hasta aquí, mi familia. A mi abuelo, me hubiera gustado que estuvieras aquí. A mi abuela, que siempre se sacrificó por los suyos. Papá, mamá, gracias por ser los mejores padres del mundo, por darme todo lo que ha hecho que hoy sea lo que soy. Gracias por sentaros conmigo de pequeña para intentar que no me desconcentraran las moscas, por enseñarme todo lo que en ningún otro sitio podría aprender. Estoy muy orgullosa de vosotros. Gracias a Tami y a Martita, por estar ahí siempre, no me imagino una vida sin hermanas. Por último gracias Manuel, por estar a mi lado en todos los momentos, por darme tantas alegrías y hacerme reír, por escucharme, secarme las lágrimas y animarme como sólo tú sabes hacer en los momentos en los que me cuestionaba lo que valía.*





## ABREVIATURAS

|                       |                                                                            |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| <b>2D-DIGE</b>        | Electroforesis bidimensional diferencial en gel                            |
| <b>AFM</b>            | Microscopía de fuerza atómica                                              |
| <b>CBS</b>            | Surfactómetro de burbuja cautiva (" <i>captive bubble surfactometer</i> ") |
| <b>CHAPS</b>          | 3-[(3-Colamidopropil)dimetilamonio]-1 propanosulfonato                     |
| <b>C<sub>mc</sub></b> | Concentración micelar crítica                                              |
| <b>CRD</b>            | Dominio de reconocimiento de carbohidratos                                 |
| <b>DDM</b>            | Dodecilmaltósido                                                           |
| <b>DPPC</b>           | Dipalmitoilfosfatidilcolina                                                |
| <b>DTT</b>            | Ditiotreitol                                                               |
| <b>GUV</b>            | Vesícula unilamelar gigante                                                |
| <b>HAPE</b>           | Edema pulmonar por elevada altitud                                         |
| <b>Hb</b>             | Hemoglobina                                                                |
| <b>HIF</b>            | Factor inducible por hipoxia                                               |
| <b>HIMF</b>           | Factor mitogénico inducible por hipoxia                                    |
| <b>IEF</b>            | Isoelectroenfoque                                                          |
| <b>IPG</b>            | Gradiente de pH inmovilizado                                               |
| <b>LA</b>             | Agregados grandes del surfactante (" <i>large aggregates</i> ")            |
| <b>LBA</b>            | Lavado broncoalveolar                                                      |
| <b>LPC</b>            | Lisofosfatidilcolina                                                       |
| <b>LPS</b>            | Lipopolisacárido                                                           |
| <b>LUVs</b>           | Vesículas unilamelares grandes                                             |
| <b>MLVs</b>           | Vesículas multilamelares                                                   |
| <b>PAGE</b>           | Electroforesis en gel de poliacrilamida                                    |
| <b>PC</b>             | Fosfatidilcolina                                                           |
| <b>PE</b>             | Fosfatidiletanolamina                                                      |
| <b>PG</b>             | Fosfatidilglicerol                                                         |
| <b>PI</b>             | Fosfatidilinositol                                                         |
| <b>pI</b>             | Punto isoeléctrico                                                         |
| <b>POPC</b>           | Palmitoil oleoil fosfatidilcolina                                          |
| <b>POPG</b>           | Palmitoil oleoil fosfatidilglicerol                                        |
| <b>PS</b>             | Fosfatidilserina                                                           |
| <b>PVDF</b>           | Polivinildifluoruro                                                        |
| <b>RMN</b>            | Resonancia magnética nuclear                                               |
| <b>ROS</b>            | Especies reactivas de oxígeno                                              |
| <b>SA</b>             | Agregados pequeños del surfactante (" <i>small aggregates</i> ")           |
| <b>SDS</b>            | Dodecilsulfato sódico                                                      |
| <b>SM</b>             | Esfingomielina                                                             |
| <b>SUVs</b>           | Vesículas unilamelares pequeñas                                            |
| <b>T<sub>m</sub></b>  | Temperatura de transición de fase                                          |
| <b>VEGF</b>           | Factor de crecimiento del endotelio vascular                               |
| <b>γ</b>              | Tensión superficial                                                        |
| <b>π</b>              | Presión superficial                                                        |



## ÍNDICE



# RELACIONES ESTRUCTURA-FUNCIÓN DEL SISTEMA SURFACTANTE PULMONAR: DETECCIÓN DE COMPLEJOS MULTIPROTEICOS NATIVOS Y PARTICIPACIÓN DEL SURFACTANTE EN LA DIFUSIÓN INTERFACIAL DE OXÍGENO.

|                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUCCIÓN .....                                                                          | 1  |
| 1.1. Fisiología respiratoria en el pulmón .....                                                | 1  |
| 1.1.1. El epitelio alveolar .....                                                              | 1  |
| 1.1.2. El intercambio gaseoso .....                                                            | 3  |
| 1.1.3. Difusión de oxígeno a través de membranas .....                                         | 5  |
| 1.1.4. La hemoglobina .....                                                                    | 6  |
| 1.1.5. La respuesta a hipoxia .....                                                            | 8  |
| 1.2. Composición del surfactante pulmonar .....                                                | 9  |
| 1.3. Funciones del surfactante pulmonar .....                                                  | 10 |
| 1.4. Metabolismo del surfactante pulmonar .....                                                | 16 |
| 1.4.1. Síntesis de los componentes del surfactante .....                                       | 16 |
| 1.4.2. Almacenamiento y ensamblaje .....                                                       | 19 |
| 1.4.3. Secreción del surfactante a la subfase acuosa .....                                     | 21 |
| 1.4.4. Degradación y reciclaje de los componentes del surfactante .....                        | 23 |
| 1.4.5. Regulación de la síntesis y secreción del surfactante .....                             | 24 |
| 1.5. Estructura y función de los componentes del surfactante pulmonar .....                    | 25 |
| 1.5.1. Fracción lipídica .....                                                                 | 25 |
| 1.5.2. Fracción proteica .....                                                                 | 27 |
| 1.6. El surfactante pulmonar en las patologías respiratorias y los surfactantes exógenos ..... | 42 |
| 1.7. Técnicas para el estudio de la función tensioactiva del surfactante pulmonar .....        | 46 |
| 1.8. Empleo de detergentes para la solubilización de proteínas de membrana .....               | 48 |
| 2. OBJETIVOS .....                                                                             | 57 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS .....                                                                  | 61 |
| 3.1. Obtención de las muestras biológicas .....                                                | 61 |
| 3.1.1. Obtención del surfactante pulmonar de cerdo y de sus fracciones .....                   | 61 |
| 3.1.1.1. Purificación del surfactante pulmonar .....                                           | 61 |
| 3.1.1.2. Obtención del extracto orgánico del surfactante .....                                 | 61 |

|                                                                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1.1.3. Purificación de las proteínas hidrofóbicas del surfactante a partir del extracto orgánico.....                                             | 62 |
| 3.1.2. Obtención de pulmón, lavados broncoalveolares, surfactante y agregados grandes y pequeños del surfactante de ratas sometidas a hipoxia ..... | 63 |
| 3.2. Técnicas bioquímicas.....                                                                                                                      | 64 |
| 3.2.1. Determinación de lípidos y proteínas .....                                                                                                   | 64 |
| 3.2.1.1. Determinación de la cantidad de fosfolípido .....                                                                                          | 64 |
| 3.2.1.2. Cuantificación de colesterol.....                                                                                                          | 64 |
| 3.2.1.3. Cuantificación de proteínas mediante análisis de aminoácidos .....                                                                         | 65 |
| 3.2.1.4. Cuantificación de proteína total mediante el método de Lowry .....                                                                         | 65 |
| 3.2.2. Separación de complejos proteicos solubilizados con detergentes .....                                                                        | 65 |
| 3.2.2.1. Centrifugación en gradiente de densidad .....                                                                                              | 66 |
| 3.2.2.2. Cromatografía de penetrabilidad Sephacryl S-400 .....                                                                                      | 67 |
| 3.2.2.3. Cromatografía de intercambio iónico Hitrap SP .....                                                                                        | 67 |
| 3.2.3. Caracterización electroforética de las proteínas .....                                                                                       | 67 |
| 3.2.3.1. Electroforesis en presencia de SDS .....                                                                                                   | 67 |
| 3.2.3.2. Tinción con plata .....                                                                                                                    | 68 |
| 3.2.3.3. <i>Western blot</i> .....                                                                                                                  | 68 |
| 3.2.3.4. Electroforesis nativas .....                                                                                                               | 69 |
| 3.2.3.5. Electroforesis bidimensional de las muestras de pulmón de rata .....                                                                       | 69 |
| 3.3. Análisis de la expresión génica.....                                                                                                           | 73 |
| 3.3.1. Obtención de RNA de pulmones de rata.....                                                                                                    | 73 |
| 3.3.2. PCR cuantitativa o a tiempo real.....                                                                                                        | 74 |
| 3.4. Técnicas de caracterización estructural de proteínas.....                                                                                      | 75 |
| 3.4.1. Reconstitución de las partículas purificadas en detergente en micelas de LPC para su caracterización estructural .....                       | 75 |
| 3.4.2. Emisión de fluorescencia intrínseca .....                                                                                                    | 76 |
| 3.4.3. Dicroísmo circular.....                                                                                                                      | 76 |
| 3.4.4. Centrifugación analítica .....                                                                                                               | 78 |
| 3.5. Técnicas de microscopía.....                                                                                                                   | 78 |
| 3.5.1. Microscopía de fuerza atómica .....                                                                                                          | 78 |

|                                                                                                                                                      |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.5.2. Microscopía electrónica .....                                                                                                                 | 79  |
| 3.6. Ensayos de caracterización funcional del surfactante pulmonar.....                                                                              | 79  |
| 3.6.1. Reconstitución de las partículas purificadas con detergente en vesículas de lípido para su caracterización funcional.....                     | 79  |
| 3.6.2. Ensayos de extensión o <i>spreading</i> .....                                                                                                 | 80  |
| 3.6.3. Surfactómetro de burbuja cautiva .....                                                                                                        | 81  |
| 3.7. Evaluación de la difusión de oxígeno a través de surfactante mediante la utilización de capilares con sonda fluorescente.....                   | 84  |
| 3.8. Generación de un modelo de la estructura tridimensional de la proteína SP-B, basado en la estructura de la saposina B .....                     | 86  |
| 4. MODELIZACIÓN DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LA SP-B BASADA EN LA ESTRUCTURA DE LA SAPOSINA B .....                                            | 89  |
| 4.1. INTRODUCCIÓN .....                                                                                                                              | 89  |
| 4.2. RESULTADOS .....                                                                                                                                | 90  |
| 4.2.1. Modelo del dímero de la SP-B.....                                                                                                             | 90  |
| 4.2.2. Modelo de la oligomerización supradimérica de la SP-B .....                                                                                   | 93  |
| 4.3. DISCUSIÓN.....                                                                                                                                  | 95  |
| 5. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE COMPLEJOS PROTEICOS NATIVOS DEL SURFACTANTE PULMONAR PURIFICADOS CON DETERGENTES .....                                    | 109 |
| 5.1. INTRODUCCIÓN .....                                                                                                                              | 109 |
| 5.2. RESULTADOS .....                                                                                                                                | 110 |
| 5.2.1. Solubilización del surfactante pulmonar con detergentes no desnaturalizantes...                                                               | 110 |
| 5.2.2. Separación mediante centrifugación en gradiente de densidad de diferentes fracciones del surfactante solubilizado con detergentes .....       | 112 |
| 5.2.3. Centrifugación en gradiente de densidad de fracciones del surfactante reconstituido y solubilizado con CHAPS .....                            | 117 |
| 5.2.4. Cromatografía de penetrabilidad de surfactante solubilizado con CHAPS.....                                                                    | 119 |
| 5.2.5. Cromatografía de intercambio iónico de surfactante solubilizado con CHAPS .....                                                               | 122 |
| 5.2.6. Caracterización estructural de la proteína purificada mediante cromatografía de intercambio iónico de surfactante solubilizado en CHAPS ..... | 125 |
| 5.2.6.1. Estudio de la estructura secundaria mediante dicróismo circular.....                                                                        | 125 |
| 5.2.6.2. Estudio de la estructura terciaria mediante espectroscopía de fluorescencia                                                                 | 126 |
| 5.2.7. Caracterización funcional de las partículas proteicas obtenidas mediante la cromatografía de intercambio iónico.....                          | 128 |

|                                                                                                                                                   |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.2.8. Organización supramolecular de la proteína SP-B .....                                                                                      | 153 |
| 5.2.8.1. Estudio del grado de oligomerización mediante electroforesis nativa y centrifugación analítica .....                                     | 153 |
| 5.2.8.2. Estudio estructural mediante microscopía electrónica de transmisión .....                                                                | 154 |
| 5.3. DISCUSIÓN .....                                                                                                                              | 157 |
| 6. PAPEL DEL SURFACTANTE PULMONAR EN LA DIFUSIÓN DE OXÍGENO A TRAVÉS DEL ALVEOLO .....                                                            | 181 |
| 6.1. INTRODUCCIÓN .....                                                                                                                           | 181 |
| 6.2. RESULTADOS .....                                                                                                                             | 182 |
| 6.2.1. Efecto del surfactante pulmonar en la difusión interfacial de oxígeno .....                                                                | 182 |
| 6.2.2. Efecto de un modelo de hipoxia en el pulmón y en la composición y función del surfactante pulmonar .....                                   | 185 |
| 6.2.2.1. Efecto de la hipoxia en el contenido total de lípido y proteína en lavados broncoalveolares, surfactante pulmonar y sus fracciones ..... | 185 |
| 6.2.2.2. Efecto de la hipoxia en la expresión relativa de los genes estudiados en pulmón .....                                                    | 186 |
| 6.2.2.3. Efecto de la hipoxia en la composición proteica de los lavados broncoalveolares .....                                                    | 187 |
| 6.2.2.4. Efecto de la hipoxia en el perfil proteómico de los lavados broncoalveolares y del tejido pulmonar .....                                 | 188 |
| 6.2.2.5. Efecto de la hipoxia en la adsorción interfacial del surfactante pulmonar .....                                                          | 198 |
| 6.3. DISCUSIÓN .....                                                                                                                              | 199 |
| 7. NUEVAS APROXIMACIONES EN EL ESTUDIO DEL SURFACTANTE PULMONAR Y PERSPECTIVAS FUTURAS .....                                                      | 217 |
| 8. CONCLUSIONES .....                                                                                                                             | 221 |
| ANEXO I: Niveles de expresión de las proteínas identificadas en los experimentos de proteómica .....                                              | 225 |
| ANEXO II: Principales funciones atribuidas a las proteínas identificadas en los experimentos de 2D-DIGE .....                                     | 231 |
| BIBLIOGRAFÍA .....                                                                                                                                | 237 |



## **INTRODUCCIÓN**

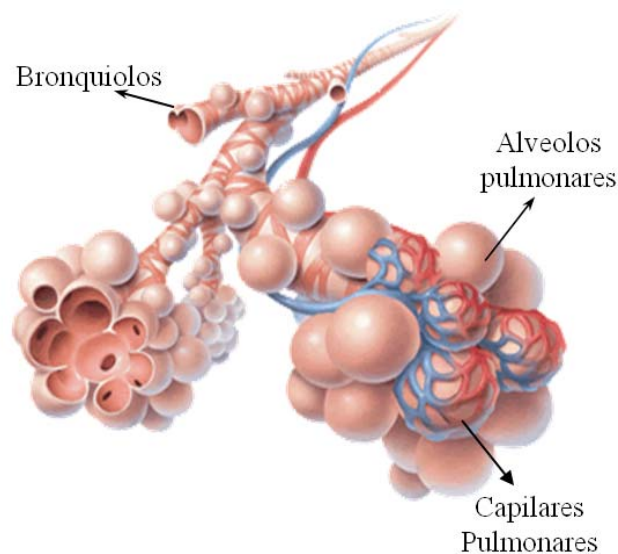


## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Fisiología respiratoria en el pulmón

#### 1.1.1. El epitelio alveolar

La respiración es el proceso fisiológico esencial para la vida mediante el cual el organismo capta el oxígeno que necesita para sus funciones metabólicas y desecha el dióxido de carbono. En los mamíferos el aire es llevado hasta las superficies de intercambio gaseoso gracias a la ventilación, que tiene lugar mediante ciclos de compresión-expansión de los pulmones (en torno a 10-20 ciclos por minuto en el caso del hombre). De esta manera el aire es conducido a través de la tráquea hacia los bronquios, que se ramifican en los bronquiolos, en cuyo extremo se localizan los alveolos, donde tiene lugar el intercambio gaseoso mediante difusión entre el aire y la sangre (figura 1). En el ser humano adulto existen aproximadamente 480 millones de alveolos de entre 75 y 300  $\mu\text{m}$  de diámetro, lo que supone una superficie de gran extensión que permite la captación de grandes cantidades de oxígeno (Daniels y Orgeig, 2003; Ochs et al., 2004).



**Figura 1.** Esquema de la terminación de los bronquiolos en los sacos alveolares y la irrigación capilar del tejido pulmonar.

Una vez en el alveolo, para llegar hasta la sangre el oxígeno tiene que atravesar la barrera alveolo-capilar, de un grosor medio en humanos de alrededor de 0.6  $\mu\text{m}$  (Maina y West, 2005), y consistente en tres capas superpuestas (figura 2):

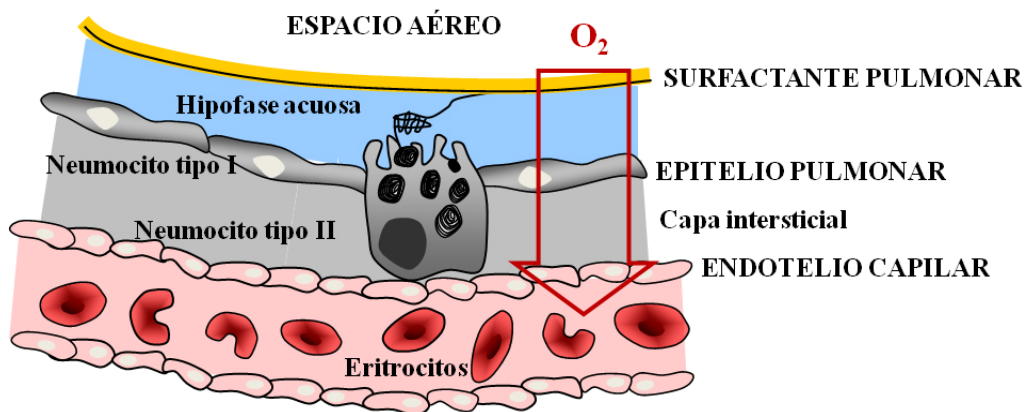
1. El **epitelio alveolar** constituye el 31% del volumen de la barrera. Está formado por dos tipos celulares:

- Los neumocitos tipo I son células planas y delgadas para facilitar la difusión gaseosa y ocupan el 90% de la superficie alveolar. Además podrían tener un papel en el mantenimiento del fluido alveolar ya que expresan canales iónicos y acuoporina 5 (Johnson, 2007; Herzog et al., 2008).
- Los neumocitos tipo II ocupan el 10% de la superficie, poseen una forma cúbica y microvellosidades apicales, y se sitúan principalmente en las esquinas de los alveolos. Son los encargados del metabolismo y secreción del surfactante pulmonar y también están implicados en el transporte de fluidos a través de sus canales de sodio y gracias a la ATPasa sodio/potasio.

Estas células pueden además diferenciarse a neumocitos tipo I en caso de daño en el pulmón (Herzog et al., 2008).

2. La **capa intersticial** constituye el 41% del volumen de la barrera. Está formada por tejido conectivo, células inmunitarias (linfocitos T) y células inflamatorias (macrófagos). Sus fibroblastos secretan la matriz extracelular que soporta la estructura del alveolo, aunque en situaciones patológicas su activación conlleva a la fibrosis pulmonar.
3. El **endotelio alveolar** constituye el 28% del volumen de la barrera. Forma parte de la red capilar que irriga el pulmón, a la que el oxígeno difunde para entrar al sistema circulatorio.

Finalmente, sobre el epitelio alveolar se encuentra una fina **capa acuosa**, en cuya interfase aire-líquido se deposita una mezcla lipoproteica llamada **surfactante pulmonar**.



**Figura 2.** Esquema de la difusión del oxígeno a través del epitelio alveolar hasta los capilares.

### 1.1.2. El intercambio gaseoso

Para que el oxígeno llegue a los tejidos, donde será utilizado en la mitocondria de las células para la síntesis de ATP, deberá disolverse en la hipofase acuosa que cubre la superficie del epitelio alveolar y cruzar una serie de barreras hasta llegar a la sangre: las membranas apical y basal de las células epiteliales, el fluido intersticial, y la membrana basal y membrana celular de las células endoteliales de los capilares. Todo esto es posible mediante difusión del oxígeno a favor de un gradiente establecido ya que la presión parcial de oxígeno en el aire (160 mm Hg en el aire atmosférico y 104 mm Hg en el aire alveolar) es mayor que en el fluido intersticial, donde a su vez es mayor que la existente en el plasma sanguíneo (40 y 95 mm Hg en la sangre venosa y arterial respectivamente) (Habler y Messmer, 1997; Guyton y Hall, 2000).

La capacidad de la sangre para absorber oxígeno está favorecida además por la presencia de la hemoglobina. Una vez que el oxígeno atraviesa la membrana del eritrocito se une a la hemoglobina, de manera que la presión parcial de oxígeno en el plasma continúa siendo baja, permitiendo que más oxígeno difunda a la sangre desde el aire. La liberación de oxígeno en el tejido se produce igualmente porque la presión parcial de oxígeno en el fluido intersticial es menor que la del plasma, y tras esta difusión la presión en el plasma cae de nuevo, causando liberación de más oxígeno por parte de la hemoglobina en el eritrocito.

El intercambio gaseoso se completa con la liberación de dióxido de carbono a la atmósfera, transportándose desde el tejido (donde es desechado como consecuencia del metabolismo celular) a los pulmones a través de la sangre. La difusión del CO<sub>2</sub> desde el fluido intersticial que rodea las células metabólicamente activas hasta el plasma también se produce por un gradiente de concentración. Una vez en el plasma sólo un 25% del CO<sub>2</sub> se une a la hemoglobina, mientras que el resto se hidrata formando ácido carbónico, que se disocia en bicarbonato y protones, produciendo éstos una acidificación del eritrocito. Esta acidificación debilita la unión del oxígeno a la hemoglobina (lo que se conoce como efecto Bohr), de manera que los tejidos que tienen una elevada actividad y que por tanto necesitan una gran cantidad de oxígeno, producirán elevadas cantidades de CO<sub>2</sub> que inducirá a la hemoglobina a liberar una dosis extra de oxígeno.

Como en todo proceso pasivo, en la difusión de oxígeno la velocidad y eficiencia del transporte del gas está influenciada por las propiedades estructurales de la barrera que atraviesa, y la capacidad de difusión a través de la barrera se correlaciona directamente con el área superficial que ocupa e inversamente con su grosor (figura 3). En el caso del pulmón, la capacidad de difusión a través de la barrera aire/sangre depende de la capacidad de difusión a través del propio epitelio alveolar y de la velocidad de unión del oxígeno a la hemoglobina una vez en la sangre. El producto del coeficiente de difusión de la barrera y el coeficiente de solubilidad del oxígeno (éste último es de 0.0029 ml de O<sub>2</sub> · dl de plasma<sup>-1</sup> · mm Hg<sup>-1</sup>) (Habler y Messmer, 1997)

constituye el coeficiente de permeabilidad, que junto con la presión parcial de oxígeno determinan la velocidad de su flujo (Maina y West, 2005; Weibel, 2009).

| Parámetros que determinan el flujo de oxígeno                                                                                                       | Causas de alteración de los parámetros                                                                                                                                                                                        |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Capacidad de difusión de la barrera:<br><br>- Área superficial de la barrera<br><br>- Grosor de la barrera                                       | Disminución de la superficie de intercambio gaseoso:<br>Pérdida de paredes alveolares (enfisema pulmonar)<br>Atelectasis<br>Aumento del grosor del epitelio alveolar:<br>Edema<br>Fibrosis pulmonar                           |
| 2. Coeficiente de permeabilidad del oxígeno a través de la barrera (coeficiente de difusión de la barrera y coeficiente de solubilidad del oxígeno) | Aumento de la ventilación y perfusión pulmonar:<br>Ejercicio intenso<br>Aclimatación a la hipoxia en altitudes elevadas<br><br>Disminución de la ventilación y perfusión pulmonar:<br>Enfermedad pulmonar obstructiva crónica |
| 3. Diferencia de presión parcial de oxígeno a ambos lados de la barrera                                                                             | Alteraciones de la presión parcial de oxígeno en el aire:<br>Altitud elevada<br><br>Alteraciones en la unión del oxígeno a la hemoglobina en la sangre:<br>Ejercicio intenso<br>Anemias                                       |

**Figura 3.** Esquema que resume los parámetros que afectan a la difusión de oxígeno a través de la barrera alveolo-capilar, así como algunas de las causas que pueden modificarla.

Aunque el mínimo grosor de la barrera alveolo-capilar es importante para permitir un buen flujo de oxígeno, ha sido necesario alcanzar un compromiso entre una barrera lo bastante fina como para asegurar una difusión pasiva y una barrera lo suficientemente resistente como para tolerar las tensiones mecánicas que se generan durante las condiciones normales de funcionamiento del pulmón. Para ello en mamíferos la barrera consta de dos tipos de zonas en cuanto a su grosor (Maina y West, 2005):

- Una zona muy fina, cuya función principal es el intercambio gaseoso. En esta zona el epitelio alveolar está formado por extensiones protoplásmicas de los neumocitos tipo I.

- Una zona más gruesa, cuya función principal es permitir el intercambio de líquidos desde el capilar pulmonar al intersticio al aumentar la presión capilar. En aquellas patologías en las que se produce edema es en esta zona en la que se engrosa especialmente la barrera. Además es la encargada de alojar las fibras de colágeno responsables de mantener la morfología de la región alveolar y soportar las fuerzas de tensión a las que se somete el alveolo.

### 1.1.3. Difusión de oxígeno a través de membranas

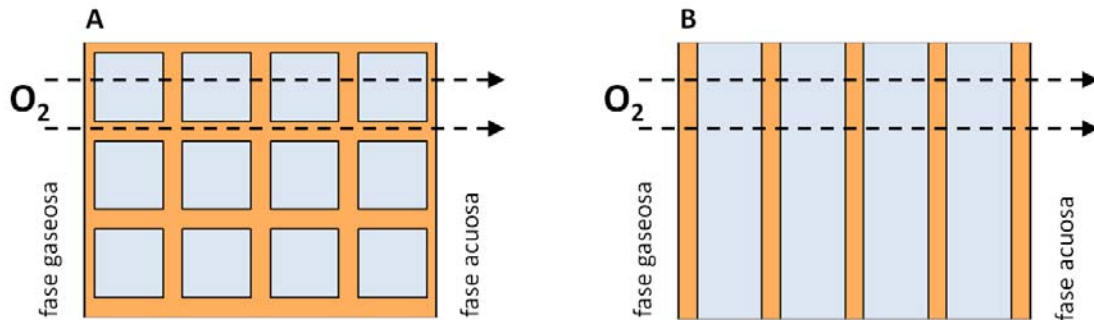
En 1975 Fischkoff y Vanderkooi estudiaron la difusión de oxígeno a través de diferentes membranas mediante medidas indirectas utilizando sondas fluorescentes, concluyendo, tal y como se creía hasta entonces, que el coeficiente de difusión a través de la membrana del eritrocito era similar al del agua, por lo que ni ésta ni otras membranas, como el surfactante pulmonar, supondrían una barrera importante a la difusión de esta pequeña molécula. Además determinaron que la difusión del oxígeno se ve favorecida por la fluidez de las membranas, de manera que es significativamente mayor a partir de la temperatura de transición de fase gel/líquido-cristalina de la mezcla lipídica en cuestión, es decir, cuando la membrana se encuentra en estado fluido (Fischkoff y Vanderkooi, 1975).

Sin embargo, al cabo de los años han aparecido estudios que cuestionan que la difusión del oxígeno a través de las membranas lipídicas sea igual que la difusión a través del agua, fundamentalmente considerando que la microviscosidad de las primeras es de 2 a 3 órdenes de magnitud mayor. Así, mediante la utilización de electrodos de oxígeno, Ivanov y colaboradores determinaron que el coeficiente de permeabilidad del oxígeno a través de membranas lipídicas era menor que en agua, sugiriendo incluso que el flujo de oxígeno a través de las membranas biológicas podría no deberse sólo a difusión, sino que podría requerir también la participación de canales proteicos (Ivanov et al., 2004).

Por otro lado, estudios de difusión de oxígeno a través de monocapas lipídicas comprimidas han revelado que la difusión de gases a través de estas películas depende también de su estado de compresión, siendo más lento el transporte de oxígeno a través de la monocapa cuando ésta se comprime y las moléculas de lípido se disponen en un estado condensado (Sánchez Macho et al., 2000).

Como se ha mencionado anteriormente, la permeabilidad de una sustancia depende en parte de su coeficiente de solubilidad. La relación entre la solubilidad de una molécula en una fase lipídica y su solubilidad en agua se conoce como el coeficiente de partición lípido/agua de la sustancia, de manera que para las moléculas hidrofóbicas este coeficiente es mayor de 1. En el caso del oxígeno, el coeficiente de partición aceite/agua es de 4.4 (Battino et al., 1968). Recientemente, un modelo teórico para el transporte por difusión de pequeñas moléculas a través de membranas sugiere que, en efecto, las estructuras lipídicas sí ejercen un efecto en la difusión, pero al contrario de lo que se concluyó en los estudios de Ivanov, y basándose en el coeficiente de partición bicapa/agua del oxígeno, este efecto sería de facilitación (Aberg et al., 2010). En su modelo, Aberg y colaboradores compararon la difusión del oxígeno a través de dos situaciones (figura 4): una en la que las membranas se encuentran dispuestas en una estructura tubular e interconectadas entre sí, y otra en la que las membranas se encuentran apiladas unas sobre otras, separadas por espacios acuosos. La conclusión a la que se llegó fue que la estructura de red tubular permite un transporte más rápido de moléculas con coeficientes de partición superiores a 1 (hidrofóbicas) que

la de membranas apiladas, ya que las regiones acuosas suponen la principal resistencia al transporte por difusión. De esta manera, una molécula con un coeficiente de partición bicapa/agua de 4.4, como el oxígeno, sería transportada un 30% más rápido a través de una estructura de membranas en forma de red tubular con intersticios acuosos de 45 nm de ancho y membranas de 5 nm de grosor (Aberg et al., 2010).



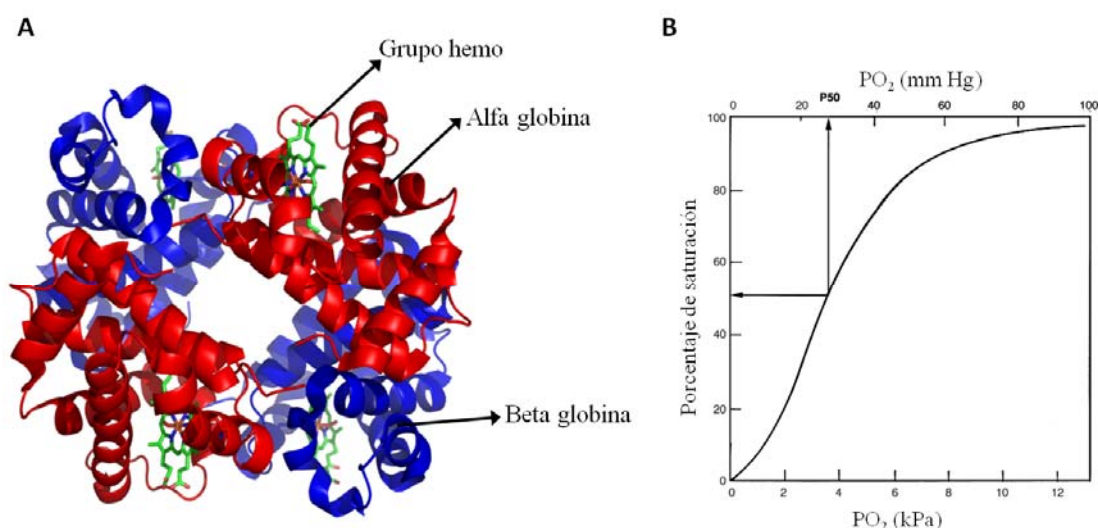
**Figura 4.** Esquema de la difusión del oxígeno a través de una red tubular de membranas interconectadas (A) o membranas apiladas sin conectar (B). En el primer caso el oxígeno puede atravesar las zonas lipídicas (en naranja) mientras que en el segundo tiene que pasar obligatoriamente por regiones acuosas (en azul). Modificado de (Aberg et al., 2010).

### 1.1.4. La hemoglobina

El oxígeno es transportado en la sangre de dos formas: disuelto en el plasma y unido a la hemoglobina en los eritrocitos. Los eritrocitos, tras el nacimiento, son producidos exclusivamente por la médula ósea, y el principal estímulo para su producción en los estados de escasez de oxígeno es la hormona eritropoyetina. La síntesis de hemoglobina comienza en los proeritroblastos y continúa incluso en el estadio de reticulocito de los eritrocitos (Guyton y Hall, 2000).

La hemoglobina predominante en humanos (HbA), como en la mayoría de los vertebrados, es un tetrámero de 64 kDa constituido por dos subunidades alfa y dos beta ( $\alpha_2\beta_2$ ) (figura 5A). La HbA constituye el 97% de la hemoglobina de un humano adulto, existiendo además otras dos variantes: la HbA<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ) que constituye el 2% y la hemoglobina fetal o HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ) el 1% (Schechter, 2008). Cada una de las subunidades de la hemoglobina contiene un grupo hemo formado por un anillo de protoporfirina unido a un átomo de hierro ferroso mediante fuerzas no covalentes. El oxígeno se une reversiblemente al grupo hemo de cada subunidad de manera cooperativa, pudiendo cada mol de hemoglobina unir como máximo 4 moles de oxígeno (Habler y Messmer, 1997).





**Figura 5. A.** Hemoglobina constituida por dos subunidades alfa y dos beta, cada una de ellas con un grupo hemo capaz de unir oxígeno. **B.** Curva sigmoideal de saturación de la hemoglobina por oxígeno.  $P_{50}$  se define como la presión de oxígeno a la que la hemoglobina está saturada al 50% (Habler y Messmer, 1997).

La curva de unión de la hemoglobina y el oxígeno sigue una cinética en 4 pasos con cooperatividad positiva, lo que implica una dependencia sigmoideal con la presión parcial de oxígeno (figura 5B). Esto es debido a que la energía de unión del oxígeno a una subunidad se transmite a las subunidades vecinas, por lo que la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno aumenta al aumentar la saturación de oxígeno. Esta característica de la unión facilita también la liberación de oxígeno en los tejidos (Schechter, 2008).

Además de la función principal de la hemoglobina en el transporte de oxígeno y  $CO_2$ , nuevos datos están sugiriendo posibles papeles alternativos de esta proteína. Su capacidad de unir NO se ha relacionado con funciones de transporte de este gas, así como de control del flujo sanguíneo (ya que el NO produce vasodilatación) y de protección frente al estrés oxidativo y nitrosidativo (Schechter, 2008). Por otro lado, la expresión de hemoglobinas en tejidos no vasculares con origen no hematopoyético apunta también a la existencia de posibles funciones aún no conocidas. De esta forma, se ha encontrado expresión de hemoglobina en neuronas cerebrales (Richter et al., 2009), riñón (Nishi et al., 2008) y macrófagos activados por lipopolisacárido (Liu et al., 1999). Especialmente interesante para esta Tesis resulta la expresión de hemoglobina en los neumocitos tipo II y en las células Clara bronquiales, ambas productoras de surfactante (Bhaskaran et al., 2005; Newton et al., 2006). Esto ha hecho proponer posibles funciones de la hemoglobina en el pulmón, como la facilitación del transporte de oxígeno a través de la barrera aire-sangre, la actuación como sensor de oxígeno, o la protección del epitelio alveolar frente al estrés oxidativo y nitrosidativo.

Por último, en cuanto a la interacción de la hemoglobina con membranas biológicas, cabe destacar los estudios realizados sobre su encapsulación en liposomas de distintas composiciones, los llamados hemosomas, que han sido utilizados como transportadores artificiales de oxígeno sustitutos de eritrocitos. En ellos se observó que la hemoglobina interacciona con las bicapas lipídicas de dos formas: mediante interacciones hidrofóbicas con la membrana, y mediante interacción iónica del hemo con las cargas negativas de la superficie de la bicapa. Ambas interacciones, aunque principalmente las iónicas, son además inhibidas por la adición de colesterol a los liposomas, efecto presumiblemente mediado por cambios en la fluidez de la membrana (Szebeni et al., 1988).

### **1.1.5. La respuesta a hipoxia**

El déficit de oxígeno que ocurre como consecuencia de la disminución de este gas en el medio, o en ciertas situaciones patológicas como en el daño agudo del pulmón, conlleva graves alteraciones en el funcionamiento de los diferentes tejidos, por lo que la respuesta a hipoxia consiste básicamente en evitar la depleción de oxígeno en la célula, mediante dos vías: asegurar la síntesis de ATP y disminuir las rutas que suponen su gasto (Jain y Sznajder, 2005).

La respuesta inmediata a la hipoxia conlleva unos efectos agudos que tienen lugar durante segundos o minutos después del estímulo hipóxico. Estos efectos dependen de la modulación de canales iónicos que conllevan cambios en la excitabilidad, contractilidad o actividad secretora de las células. La principal respuesta aguda a la hipoxia es constituida por la regulación de la contracción/relajación de la vasculatura a través de cambios de permeabilidad de los canales de potasio de los miocitos de los vasos, de manera que se produce la vasoconstricción de la vasculatura pulmonar y la vasodilatación sistémica (principalmente en los vasos coronarios y cerebrales) (Lopez-Barneo et al., 2001).

La exposición crónica a hipoxia durante horas o días provoca respuestas a nivel transcripcional que determinan la expresión de numerosos genes a través de varios factores de transcripción, como los factores inducibles por hipoxia HIF-1, HIF-2 y HIF-3. El primero es un heterodímero formado por HIF-1 $\beta$ , que se expresa constitutivamente, y HIF-1 $\alpha$ , que es inducido por la hipoxia a través de diversos mecanismos: inducción de la transcripción, estabilización del mRNA, translocación al núcleo e inhibición de su degradación por el proteosoma. HIF-1 se une a los elementos de respuesta a hipoxia en los promotores de varios genes, como el del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), que está implicado en las respuestas vasculares a hipoxia, y el factor mitogénico inducible por hipoxia (HIMF), que produce efectos angiogénicos y vasoconstrictores (Lopez-Barneo et al., 2001; Semenza, 2005; Tong et al., 2006b). De esta forma, los principales efectos crónicos de la hipoxia son la activación del metabolismo anaerobio de glucosa, y la activación de la eritropoyesis y la angiogénesis que conllevan a la hipertrofia pulmonar, lo que junto con la vasoconstricción contribuye a la hipertensión pulmonar (Jain y Sznajder, 2005).

En cuanto a los efectos de la hipoxia en el epitelio alveolar, cabe resaltar el papel de la ATPasa sodio/potasio. Esta bomba de la membrana basolateral de las células epiteliales crea un gradiente osmótico de sodio gracias al cual el agua es reabsorbida de los espacios alveolares al intersticio. En estados de hipoxia, como en el edema pulmonar por elevada altitud (HAPE), se produce una disminución en la expresión de la ATPasa ya que se intenta reducir el gasto de energía, resultando en un edema de los alveolos que impide la correcta difusión del oxígeno del aire. Además, la hipoxia induce proliferación de células epiteliales alveolares y reclutamiento de células inmunes al espacio alveolar a través del VEGF, así como una reorganización del citoesqueleto celular que podría aumentar la permeabilidad de la barrera epitelial (Jain y Sznajder, 2005).

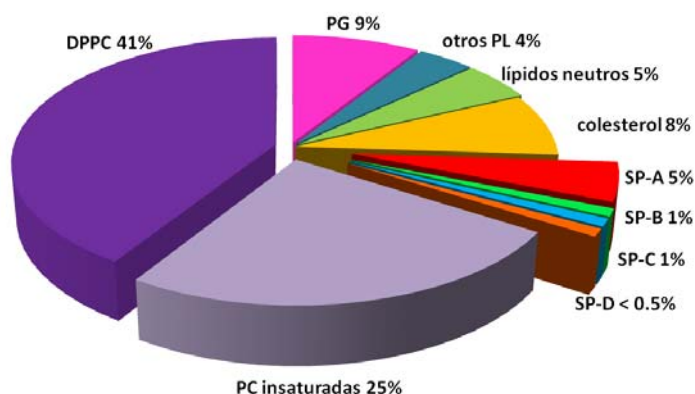
Por último es importante resaltar la relación existente entre las especies reactivas de oxígeno (ROS) y la hipoxia. Estos radicales son generados como consecuencia del metabolismo del oxígeno y pueden resultar tóxicos, como en el caso de los radicales superóxido e hidroxilo. Su relación con la hipoxia no está clara, pues algunos investigadores han encontrado un aumento de ROS debido a la hipoxia y otros, una disminución (Weir et al., 2005).

## 1.2. Composición del surfactante pulmonar

El surfactante pulmonar es una mezcla de lípidos y proteínas cuya función principal es disminuir la tensión superficial en la interfase aire-líquido de los alveolos. Su composición consiste aproximadamente en un 90% de lípidos y un 10% de proteínas (figura 6). El contenido lipídico está principalmente constituido por fosfolípidos, de los que la especie predominante en los mamíferos homeotermos es la dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), que representa aproximadamente un 40% del total del surfactante en peso, y es el principal responsable de su función tensioactiva. Además, el surfactante contiene otras fosfatidilcolinas (PC) insaturadas (25%), fosfolípidos aniónicos, principalmente fosfatidilglicerol (PG) y fosfatidilinositol (PI), otros fosfolípidos como fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS) y esfingomielina (SM), así como lípidos neutros, de los que el más abundante es el colesterol (8-10%) (Goerke, 1998; Veldhuizen et al., 1998).

Existen diferencias en la composición lipídica del surfactante entre las diversas especies animales. En la mayoría de ellas el fosfolípido aniónico más abundante en adultos es PG, siendo PI el mayoritario durante la etapa fetal y prenatal. No obstante existen especies, como el cerdo, en las que PI constituye el fosfolípido aniónico predominante, aunque el contenido total de fosfolípidos aniónicos permanece relativamente constante (Perez-Gil y Weaver, 2010). Además se observa una disminución de los fosfolípidos disaturados, como la DPPC, y un aumento de colesterol en el surfactante de animales con una menor temperatura corporal, como peces pulmonados y anfibios, en comparación a los mamíferos. La consecuencia de esta mayor relación colesterol/lípidos disaturados es una mayor fluidez del surfactante

asociada a una peor actividad interfacial del mismo, que podría indicar una función primitiva de este surfactante relacionada más con un papel antiadhesivo y no tanto de reducción de la tensión superficial (Daniels y Orgeig, 2001). Recientemente se está poniendo de manifiesto que el perfil de composición fosfolipídica del surfactante puede ser mucho más variable de lo inicialmente supuesto. Por ejemplo, el surfactante de mamíferos heterotermos, cuya temperatura corporal está sometida a importantes variaciones, presenta mucho menores proporciones de fosfolípidos disaturados y fracciones significativas de especies moleculares prácticamente inexistentes en el surfactante de animales homeotermos (Lang et al., 2005).



**Figura 6.** Composición de un surfactante pulmonar tipo en porcentaje de peso seco.

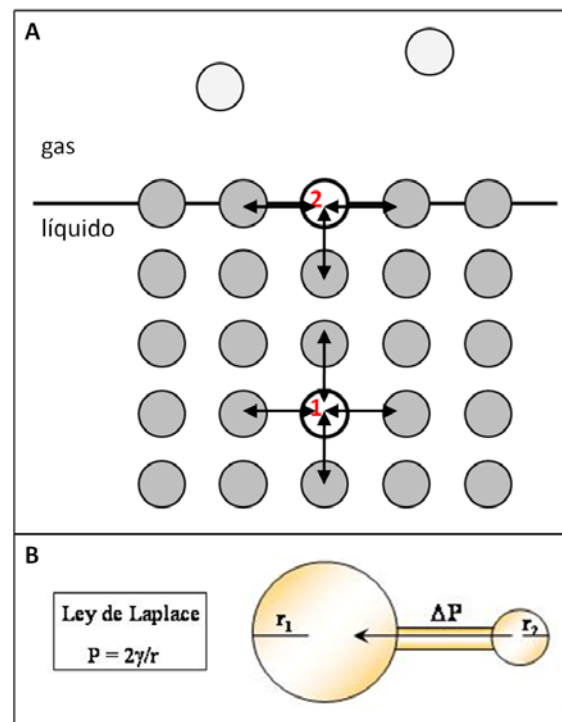
Respecto a su contenido en proteínas, el surfactante contiene cuatro proteínas específicas: SP-A y SP-D (hidrofílicas) y SP-B y SP-C (hidrofóbicas). La SP-A es la proteína mayoritaria del surfactante (aproximadamente un 5%) y junto con la SP-D está esencialmente implicada en las funciones inmunológicas y de defensa del surfactante, mientras que las proteínas hidrofóbicas son importantes para su función interfacial (Johansson y Curstedt, 1997; Orgeig et al., 2010).

### 1.3. Funciones del surfactante pulmonar

#### 1. Reducción de la tensión superficial en la interfase aire-líquido

En cualquier líquido, la distancia entre sus moléculas es de varios órdenes de magnitud menor que en un gas. Así, las moléculas de la fase líquida pueden establecer interacciones con las moléculas que las rodean en todas las direcciones (figura 7A). Sin embargo, las moléculas dispuestas en la región interfacial, y como consecuencia de la ausencia de interacciones con la fase gas, presentan un componente neto cohesivo hacia

la masa de líquido. Esto causa que la superficie minimice su área, pues abrir nueva interfase supone trasladar a ésta moléculas adicionales del líquido, que deben romper una parte de las interacciones que podrían formar en su seno y ahora no pueden establecer en la superficie, lo que cuesta energía. Esta energía da lugar a la generación de una tensión superficial ( $\gamma$ ), que es la fuerza necesaria para expandir el área superficial del sistema. Un surfactante es una molécula anfipática que tiene preferencia por la interfase aire-líquido, en donde se orienta formando películas monomoleculares capaces de disminuir la tensión superficial, ya que las fuerzas atractivas entre las moléculas del surfactante y las del líquido son menores que las del líquido entre sí (Notter, 2000).



**Figura 7. A.** Fuerzas moleculares que causan la tensión superficial. La molécula (1) en la masa de líquido interacciona de manera compensada con las moléculas que la rodean, mientras que la molécula interfacial (2) experimenta un componente neto de atracción hacia el interior de la fase líquida (Notter, 2000). En **B** se muestra la ecuación que define la Ley de Laplace, que indica que la presión ( $P$ ) que tiende a cerrar una burbuja es directamente proporcional a la tensión superficial ( $\gamma$ ) e inversamente proporcional al radio de la burbuja. Si no existiera el surfactante pulmonar, los alveolos pequeños colapsarían dentro de los mayores durante la espiración, debido a la diferencia de presión entre cámaras interconectadas de diferente tamaño.

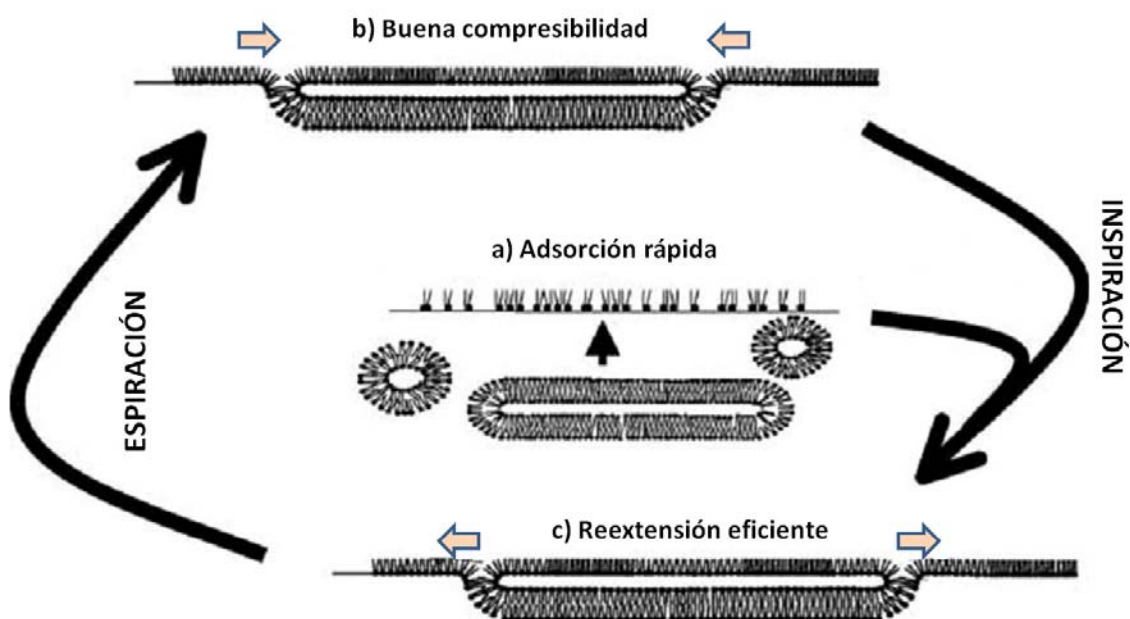
La presión superficial ( $\pi$ ) se define como la reducción de tensión superficial por la presencia de una película de material surfactante, de manera que matemáticamente se define como:

$$\pi = \gamma_0 - \gamma$$

donde  $\gamma_0$  es la tensión superficial del agua y  $\gamma$  es la tensión superficial cuando el surfactante está presente en la superficie (Notter, 2000).

Según la Ley de Laplace, la presión en el interior de una burbuja es directamente proporcional a la tensión superficial e inversamente proporcional al radio de la burbuja, de manera que cuanto menor es la burbuja, mayor es la presión que soportan sus paredes (figura 7B). De cumplirse esta relación en los pulmones, la disminución del tamaño de alveolos de diferente radio durante la espiración provocaría el colapso y vaciado de los alveolos más pequeños debido a la alta tensión superficial ( $\approx 70$  mN/m) de la capa de fluido que cubre el epitelio alveolar. Así, la principal función del surfactante pulmonar es la de reducir  $\gamma$  de manera muy notable, gracias principalmente al fosfolípido mayoritario que lo forma, la DPPC, que debido a su estructura molecular es capaz de empaquetarse formando películas interfaciales muy densas, ordenadas y estables. Estas películas pueden alcanzar valores de tensión superficial de menos de 1 mN/m al ser comprimidas lateralmente por la disminución del área en el alveolo durante la espiración (Possmayer et al., 2001).

Para poder cumplir eficientemente su función tensioactiva, es decir, reducir el trabajo de expandir los pulmones al inspirar y estabilizar los alveolos durante la espiración, el surfactante pulmonar debe poseer tres propiedades esenciales (figura 8) (Perez-Gil y Keough, 1998; Perez-Gil, 2002):



**Figura 8.** Propiedades esenciales del surfactante pulmonar en la interfase aire-líquido: a) Adsorción rápida desde la subfase acuosa hasta la interfase durante la inspiración; b) Capacidad de alcanzar tensiones superficiales próximas a 0 mN/m durante la espiración; c) Re-extensión rápida y eficiente del material para restablecer la película interfacial durante la inspiración.

*a) Adsorción rápida a la interfase durante la inspiración*

El surfactante es secretado por los neumocitos tipo II a la fina capa de líquido que recubre el epitelio y que constituye la subfase acuosa, en forma de bicapas altamente empaquetadas. Estas membranas de surfactante deben adsorberse rápidamente a la interfase, donde las moléculas deberán formar la película interfacial o insertarse en la película previamente formada. A pesar de que la DPPC es la especie más eficaz del surfactante en lo que se refiere a la disminución de la tensión superficial, las membranas de este lípido no presentan una adsorción interfacial muy eficiente, por lo que se requiere la presencia del resto de componentes del surfactante, principalmente los fosfolípidos insaturados (Veldhuizen et al., 1998) y las proteínas hidrofóbicas. Aunque la proteína mayoritaria del surfactante, la SP-A, no es esencial para la mecánica respiratoria, su presencia parece favorecer la adsorción interfacial, lo que podría estar relacionado con su capacidad de unión selectiva a DPPC (Casals et al., 1993). Además, se ha observado un efecto cooperativo en la adsorción interfacial de fosfolípidos en presencia de SP-A, SP-B y calcio (Taneva y Keough, 2000). Así mismo, el colesterol parece favorecer la adsorción de vesículas de DPPC en ciertas condiciones (Taneva y Keough, 1997; Veldhuizen et al., 1998; Orgeig y Daniels, 2001), aunque su efecto en presencia de las proteínas hidrofóbicas no está claro y será tratado más adelante en esta introducción. Por último cabe mencionar que esta primera fase de la adsorción resulta ser críticamente dependiente de la concentración de surfactante en la subfase (Walters et al., 2000; Zuo et al., 2008).

Una vez que estas membranas se han desplazado a compartimentos cercanos a la interfase, es necesario que se asocien a la película interfacial, para lo cual son importantes las interacciones bicapa/bicapa y bicapa/monocapa, que son facilitadas por las proteínas hidrofóbicas SP-B y SP-C (Perez-Gil y Keough, 1998) incluyendo sus interacciones iónicas con los fosfolípidos aniónicos, principalmente PG (Walters et al., 2000; Rodriguez-Capote et al., 2001).

Por último, para que los lípidos sean insertados en la película interfacial, se requiere la perturbación simultánea de las bicapas y monocapas lipídicas, acción probablemente facilitada por las proteínas hidrofóbicas del surfactante (Nag et al., 1997).

De esta manera, la película de lípido reemplaza a la capa superficial de moléculas de agua, reduciendo la tensión superficial en la interfase desde 70-72 mN/m hasta una tensión de equilibrio en torno a 25 mN/m en la que la monocapa está saturada de moléculas de lípido, o lo que es lo mismo, aumentando la presión superficial hasta valores de alrededor de 45 mN/m (Possmayer et al., 2001).

### *b) Reducción de la tensión superficial a valores cercanos a 0 mN/m durante la espiración*

Como se ha comentado anteriormente esta propiedad es posible gracias a la presencia en las películas interfaciales de la DPPC. Al comprimirse lateralmente durante la espiración las películas de surfactante adsorbidas a la interfase, la tensión superficial disminuye por debajo de la tensión de equilibrio hasta una tensión menor a 1 mN/m, alcanzándose un estado metaestable que estabiliza los alveolos (Possmayer et al., 2001). Presumiblemente, parte del material es excluido de la interfase al alcanzarse estas altas presiones, quedando asociado a la película interfacial formando parte de un reservorio multilamelar (los diferentes modelos propuestos al respecto serán expuestos más adelante). Las proteínas hidrofóbicas del surfactante podrían estar implicadas en favorecer la estabilidad lateral de la película comprimida (SP-B), así como en aumentar su flexibilidad reduciendo la histéresis (pérdida irreversible de material) durante los ciclos continuos de compresión/expansión de la película (SP-C), probablemente gracias a su capacidad para favorecer la formación y estabilización del reservorio multicapa asociado a la interfase (Perez-Gil y Keough, 1998; Rodríguez-Capote et al., 2001). Por otro lado, se ha sugerido que el colesterol puede limitar la capacidad de reducción de tensión superficial a elevadas presiones, ya que no es fácilmente excluido de la película interfacial (Veldhuizen et al., 1998). Recientemente se ha propuesto que la proteína SP-C podría tener un papel particular en favorecer la formación de estados comprimidos a alta presión en películas interfaciales que contienen colesterol (Gomez-Gil et al., 2009; Baumgart et al., 2010). Esto sería posible gracias al establecimiento de interacciones de SP-C con regiones ricas en colesterol en contactos bicapa/bicapa o bicapa/monocapa.

### *c) Re-extensión del material excluido durante la compresión para formar nuevamente la película durante la inspiración*

Durante la expansión de la interfase, en la inspiración, el material del reservorio debe ser rápidamente re-insertado a la película interfacial, proceso en el cual están probablemente implicadas las proteínas hidrofóbicas SP-B y SP-C y los fosfolípidos insaturados (Nag et al., 1997; Veldhuizen et al., 1998). De esta manera, la película interfacial se re-establece en los estados competentes para volver a producir las mínimas tensiones superficiales durante los subsiguientes ciclos de compresión.

## 2. Mantenimiento de la homeostasis del líquido alveolar

El aumento de la tensión superficial en el pulmón tendría como consecuencia un incremento en la presión hidrostática de los capilares, lo que produciría un aumento en la filtración transvascular al intersticio y al espacio alveolar, generando edema pulmonar (Ganter et al., 2006).

Así pues, el surfactante pulmonar también ayuda a controlar el balance de fluidos (Daniels et al., 1998), de manera que su falta o alteración en ciertas patologías



respiratorias está asociada a la aparición de edema agudo de pulmón debido a alteraciones de la permeabilidad en la barrera alveolo-capilar (Gunther et al., 2001).

### 3. Defensa del organismo ante patógenos

La gran superficie respiratoria que el pulmón expone al exterior para permitir el intercambio gaseoso supone también una exposición continua a entidades potencialmente patogénicas, por lo que el pulmón ha de contar con un sistema de defensa ante ellas. La barrera física del epitelio de las vías aéreas está constituida por la secreción y evacuación mucociliar, mientras que las células epiteliales también son capaces de producir mediadores (como las citoquinas) capaces de activar y reclutar células (como los macrófagos y los neutrófilos) que eliminen la infección (Orgeig et al., 2010).

Además de su función en la estabilización del epitelio alveolar, el surfactante pulmonar participa en el establecimiento de mecanismos de defensa innata en el pulmón, siendo las principales responsables de dicho papel las proteínas hidrofílicas SP-A y SP-D (Wright, 2003). La SP-A media respuestas pro o antiinflamatorias según actúe de manera directa sobre los microorganismos uniéndose al lipopolisacárido bacteriano (LPS) o a través de activación de células fagocitarias, siendo reconocida por receptores específicos en los macrófagos alveolares (Orgeig et al., 2010). La SP-D, que también une LPS, promueve eliminación de patógenos sin la estimulación de una respuesta inmune secundaria (Kuroki et al., 2007).

Por otro lado los lípidos del surfactante suprimen algunas de las funciones de las células inmunes, principalmente la proliferación de linfocitos, que a su vez es aumentada por la SP-A, por lo que la relación proteína/lípido en el surfactante parece de vital importancia para la regulación del estatus inmune del pulmón (Wright, 1997). Cabe destacar el papel de los fosfolípidos aniónicos del surfactante PG y PI en la inhibición de las respuestas inflamatorias pulmonares inducidas por LPS (Kuronuma et al., 2009), manteniendo de esta manera, junto con las colectinas SP-A y SP-D, un estado basal de supresión en el pulmón que evita la inflamación crónica en los espacios alveolares.

Finalmente, también cabe mencionar la interacción de la SP-C con el LPS, lo que ha hecho proponer un papel inmunomodulador para esta proteína durante los procesos inflamatorios en el pulmón (Augusto et al., 2003).

### 4. Función anti-adhesiva

En el pulmón, el surfactante no sólo se encuentra en los alveolos, sino también en los bronquiolos y pequeñas vías aéreas, donde su principal función es prevenir la adhesión de las paredes bronquiolares, reduciendo las interacciones adhesivas entre las superficies respiratorias (Daniels et al., 1998; Zuo et al., 2008). En este sentido, cabe mencionar la existencia de surfactantes no pulmonares en la barrera gástrica mucosa,

pleura, cartílago articular y ojo, cuya función es meramente lubricante. En relación a ellos, se han encontrado también proteínas del surfactante en el intestino, membrana sinovial y peritoneo (SP-A) y en el tubo de Eustaquio y piel (SP-B) (Hills, 1999).

La función anti-adhesiva podría constituir el principal papel del surfactante pulmonar en vertebrados no mamíferos, ya que éstos colapsan los pulmones de manera rutinaria, lo que requiere una lubricación para evitar una adhesión excesiva de las paredes durante el colapso. Como se ha comentado anteriormente, el surfactante de estos animales (peces, anfibios y reptiles) presenta una mayor relación colesterol/lípidos disaturados y una menor función interfacial, ya que el mayor tamaño de las unidades respiratorias respecto al tamaño del animal (1000 veces mayores que los alveolos de los mamíferos) proporciona una estabilidad intrínseca que no requiere la disminución de la tensión superficial a valores próximos a cero (Daniels et al., 1998; Daniels y Orgeig, 2001).

### **1.4. Metabolismo del surfactante pulmonar**

El surfactante es sintetizado por los neumocitos tipo II y almacenado en éstos en forma de membranas altamente empaquetadas que son secretadas al espacio acuoso alveolar. Desde aquí, y previa conversión en estructuras extracelulares características, el surfactante se adsorbe a la interfase aire-líquido formando la película necesaria para llevar a cabo su función tensioactiva. La mayoría de estas estructuras requieren el ensamblaje adecuado de elementos de tipo bicapa, desde la síntesis hasta la inserción interfacial del material, y son importantes para una funcionalidad eficiente del surfactante.

#### **1.4.1. Síntesis de los componentes del surfactante**

Aunque parte del surfactante es reciclado tras ejercer su función tensioactiva en la multicapa interfacial, para mantener un aporte continuo de material es necesaria también una síntesis de novo de sus componentes. Ésta tiene lugar en los neumocitos tipo II, siendo las proteínas, a excepción de la SP-C, también expresadas por las células Clara (células epiteliales bronquiolares). En cualquier caso, la secreción de SP-A y SP-B por parte de estas células no parece contribuir al pool del surfactante pulmonar (Weaver, 1998).

##### *Síntesis de los lípidos*

Tiene lugar en el retículo endoplásmico de los neumocitos tipo II. La síntesis del lípido mayoritario del surfactante, DPPC, se puede realizar por dos vías: síntesis de novo o mediante remodelación de PC insaturada. Esta última vía es la principal (75% de la DPPC), y en ella están implicadas ciertas enzimas como las fosfolipasas A<sub>2</sub> y peroxirredoxina 6 (dependiente e independiente de calcio respectivamente) y la lisofosfatidilcolina aciltransferasa. La síntesis de PG depende principalmente de la enzima fosfatidilglicerofosfato sintasa (Perez-Gil y Weaver, 2010). En cuanto al

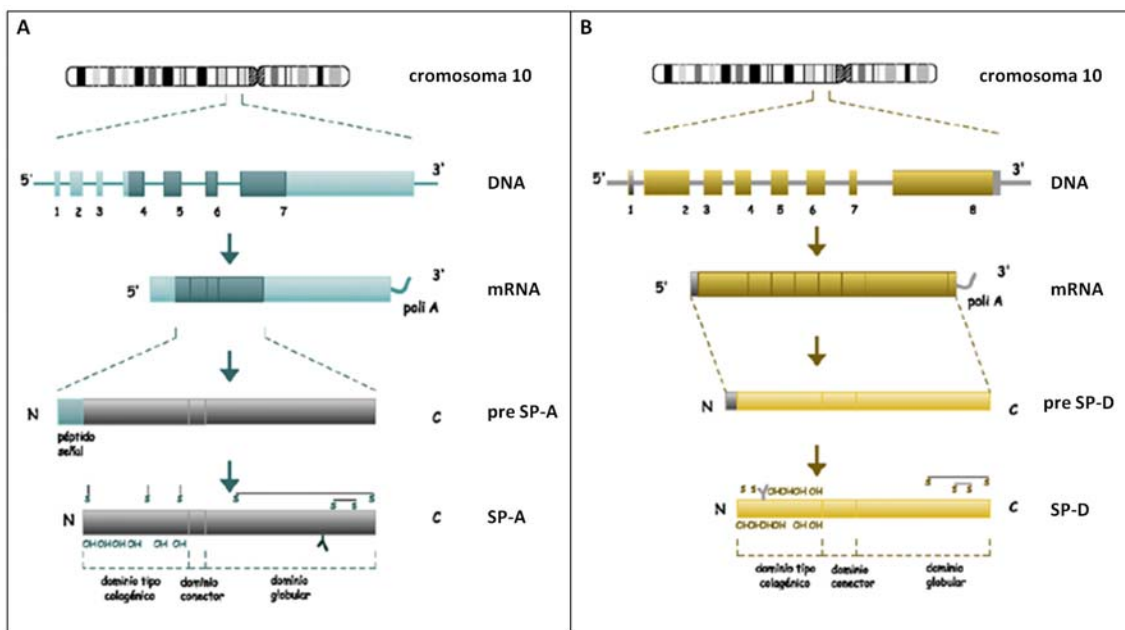
colesterol, el 90-99% deriva de las lipoproteínas séricas, principalmente VLDL (Guthmann et al., 1997).

Desde el retículo endoplásmico hasta los cuerpos lamelares en los que serán ensamblados y secretados, los lípidos son transportados mediante diferentes vías: i) transporte vesicular (pasando por el aparato de Golgi y los cuerpos multivesiculares), ii) transporte no vesicular y iii) difusión directa entre el retículo y los cuerpos lamelares, lo que conlleva participación de proteínas que aseguren el contacto transitorio entre ambas estructuras (Perez-Gil y Weaver, 2010).

#### *Síntesis y procesamiento de la SP-A*

Esta proteína es la más abundante en el surfactante y consiste en un oligómero complejo de 18 monómeros ensamblados en forma de hexámero de trímeros. El tamaño molecular de cada monómero está entre 28 y 36 kDa, dependiendo del número de oligosacáridos unidos a la proteína, lo que supone una masa molecular del oligómero de en torno a 650 kDa (Weaver y Whitsett, 1991).

En humanos es codificada por dos genes del brazo largo del cromosoma 10, a diferencia del resto de especies en las que sólo está codificada por un gen (Floros et al., 2009). El propéptido (figura 9A) contiene un péptido señal, un dominio tipo colágeno N-terminal y un dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD). En el lumen del retículo endoplásmico, la SP-A sufre una glicosilación y finalmente es ensamblada como multímero, no partiendo hacia el Golgi hasta que no está correctamente oligomerizada (Weaver y Whitsett, 1991).



**Figura 9.** Síntesis y procesamiento de la SP-A (A) y SP-D (B) humanas.

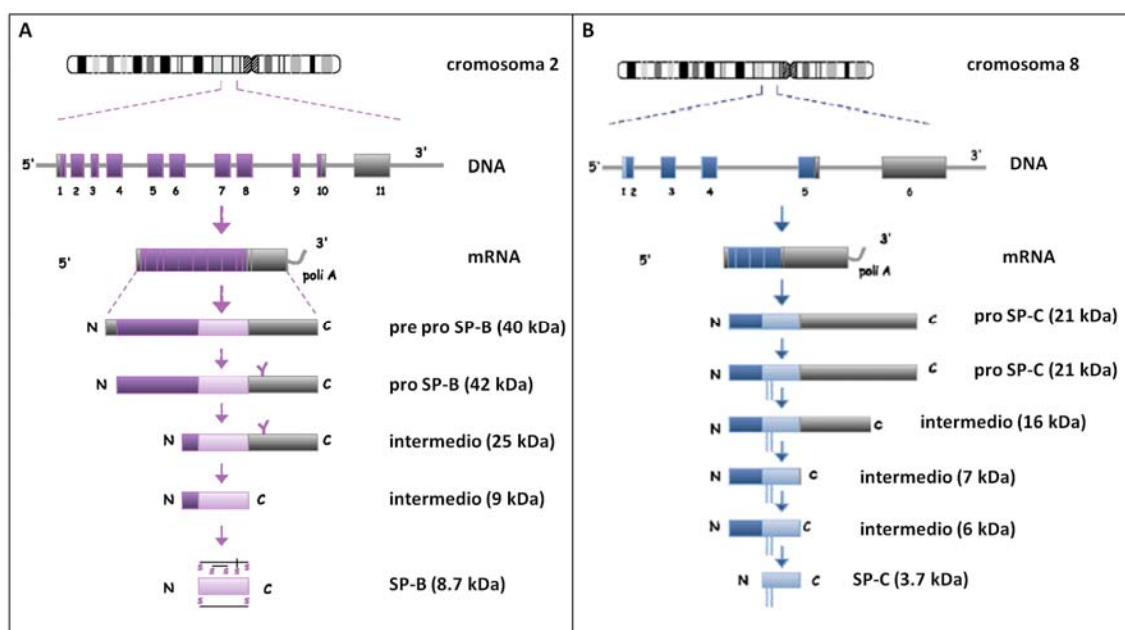
### *Síntesis y procesamiento de la SP-D*

El gen que codifica para la SP-D humana se encuentra en el cromosoma 10 y el procesamiento de la proteína es similar al de la SP-A (figura 9B), dando lugar finalmente a la proteína madura, que consiste en monómeros glicosilados de 43 kDa que oligomerizan formando un tetrámero de trímeros (Crouch, 2000).

### *Síntesis y procesamiento de la SP-B*

El gen que codifica la SP-B está localizado en el cromosoma 2, dando lugar su expresión a una proteína de 381 aminoácidos en humanos (figura 10A). Esta preproteína, de 42 kDa, está formada por un péptido señal de 20-23 aminoácidos (que media la translocación al lumen del retículo endoplásmico y que es cortado en este orgánulo) y 3 dominios tipo saposina ubicados respectivamente en un propéptido de 176 aminoácidos, el péptido maduro de 79, y un dominio C-terminal glicosilado de 102 aminoácidos, siendo necesario el dominio N-terminal para el correcto procesamiento y direccionamiento intracelular de la pro SP-B (Weaver y Whitsett, 1991; Weaver, 1998; Zaltash y Johansson, 1998; Guttentag, 2008).

Desde el retículo, la proSP-B es transportada rápidamente al Golgi y su procesamiento proteolítico tiene lugar más tarde en los cuerpos multivesiculares, estando implicadas en él las enzimas napsina A, catepsina H y pepsinógeno C (Guttentag, 2008; Perez-Gil y Weaver, 2010). Se ha encontrado que el propéptido N-terminal es transportado junto con la SP-B madura en los cuerpos lamelares, lo que resalta la importancia de la implicación de dicho propéptido en el direccionamiento y el ensamblaje adecuado de la proteína madura (Brasch et al., 2004). Además de la SP-B madura, constituida por un dímero de 8.7 kDa por monómero, también son secretadas, aunque en parte parece que de manera independiente a los cuerpos lamelares, la preproteína de 40 kDa (sin el péptido señal), un intermediario de 25 kDa formado por el péptido maduro más el extremo C-terminal y los propéptidos C y N-terminal (Perez-Gil y Weaver, 2010). El módulo saposina derivado del propéptido N-terminal ha sido detectado y aislado de los espacios alveolares mostrando actividad antibiótica a pH ácido, probablemente relacionada con la eliminación de patógenos por los macrófagos alveolares (Yang et al., 2009). Considerando que varias proteínas de la familia de las saposinas son citotoxinas (Bruhn, 2005) y que la propia proteína SP-B tiene actividad antibiótica (Ryan et al., 2006), es muy posible que la saposina derivada del propéptido C-terminal de la proSP-B juegue también un papel en la defensa innata alveolar. En resumen, el complejo procesamiento de la SP-B es importante para la activación de la proteína madura en el sitio correcto, para evitar efectos nocivos en las membranas celulares como consecuencia de sus propiedades líticas, y por otro lado, para la generación de los péptidos N y C-terminal a partir de la proSP-B, lo que atiende también a funciones relacionadas con la defensa en el pulmón.



**Figura 10.** Síntesis y procesamiento de la SP-B (A) y SP-C (B) humanas.

### *Síntesis y procesamiento de la SP-C*

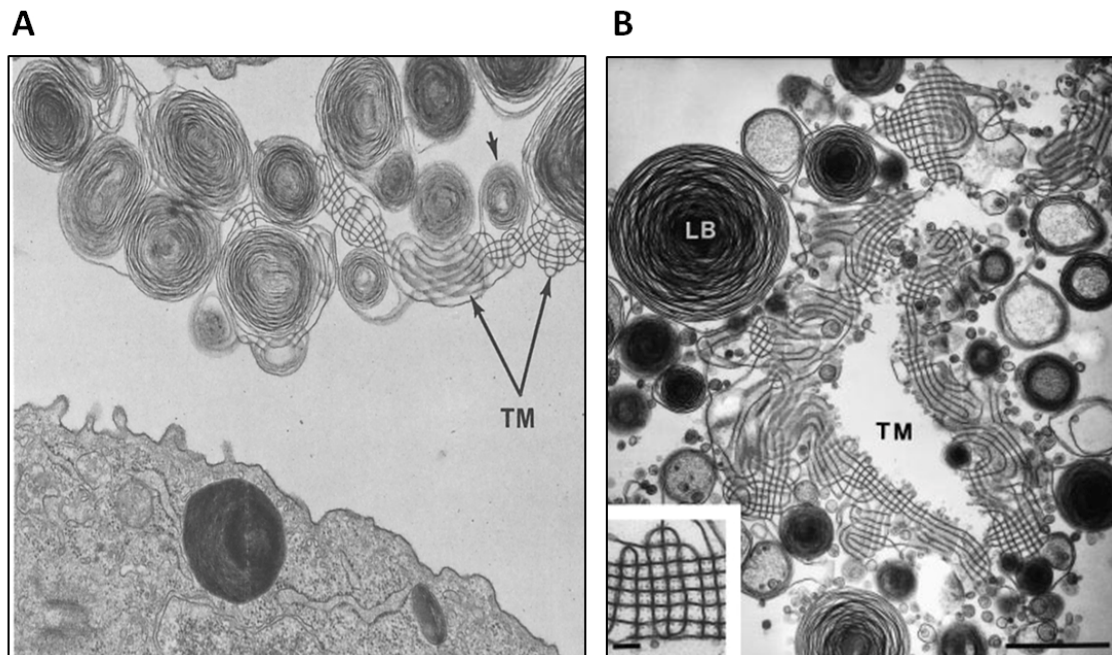
El gen de la SP-C, en el cromosoma 8, da lugar en humanos a una proproteína de 197 aminoácidos y una masa molecular de 21 kDa (figura **10B**), que se dispone de manera transmembranal en el retículo endoplásmico. Está formado por un propéptido N-terminal de 23 aminoácidos, el péptido maduro de 35 y un propéptido C-terminal de 139 aminoácidos (Beers y Mulugeta, 2005).

Tras sufrir palmitoilación en las cisteínas 5 y 6, probablemente en el tránsito del retículo al Golgi, tienen lugar una serie de cortes proteolíticos que generan diversos péptidos intermedios hasta liberarse la proteína madura, de tan sólo 3.7 kDa. El procesamiento proteolítico tiene lugar en los cuerpos multivesiculares con la participación, al igual que en el caso de la SP-B, de la catepsina H (Perez-Gil y Weaver, 2010). Además es importante destacar que la expresión de la SP-B es estrictamente necesaria para el correcto procesamiento de la SP-C, sin que se conozca aún la razón (Weaver y Conkright, 2001).

### **1.4.2. Almacenamiento y ensamblaje**

La mayor parte de los componentes del surfactante son acumulados en los **cuerpos lamelares** hasta su secreción (Weaver, 1998). Se trata de estructuras más o menos esféricas que contienen un gran número de membranas aparentemente concéntricas, altamente empaquetadas, formadas por los lípidos y las proteínas hidrofóbicas del surfactante (figura **11**). En ellos también se puede encontrar SP-A (Ravasio et al., 2010), aunque sólo el 7-8% de esta proteína parece estar asociada a los cuerpos lamelares, lo que sugiere que la mayor parte de la SP-A sigue una ruta de

secreción alternativa (Oosterlaken-Dijksterhuis et al., 1991). En este sentido, estudios de marcaje han revelado una secreción constitutiva de SP-A no acoplada a los cuerpos lamelares, siendo la proteína posteriormente recapturada por éstos, lo que explica su presencia en dichos orgánulos (Osanai et al., 2006). No obstante, recientes evidencias han hecho considerar de nuevo la posibilidad de que una parte de la SP-A se ensamble junto con los lípidos en los cuerpos lamelares (Fisher, 2011). Además de las densas lamelas, en los cuerpos lamelares aparece un material central homogéneo y denso no lamelar, formado principalmente por enzimas (Williams, 1977), y que resulta especialmente importante ya que el procesamiento final de las proteínas SP-B y SP-C tiene lugar en el cuerpo lamelar, acoplado a la acidificación en dicho orgánulo.



**Figura 11.** Imágenes de microscopía electrónica de pulmón de rata en las que aparecen cuerpos lamelares (LB) y mielina tubular (TM). **A)** En la parte inferior de la imagen se observa un neumocito tipo II con un cuerpo lamelar. Además se observan cuerpos lamelares secretados y mielina tubular en formación (Williams, 1977). **B)** Cuerpos lamelares y mielina tubular secretados al espacio alveolar. Abajo a la izquierda se muestra un detalle de mielina tubular (Goerke, 1998).

Para la correcta biogénesis de los cuerpos lamelares es imprescindible la existencia de la SP-B, de manera que cuando falta ésta, hay un déficit completo de estos orgánulos y una acumulación de cuerpos multivesiculares. Otra proteína esencial implicada en la biogénesis del cuerpo lamelar es la proteína ABCA3. Esta proteína, perteneciente a la familia de los transportadores acoplados a la unión e hidrólisis de ATP, es una translocasa lipídica que utiliza la energía de la hidrólisis de ATP para internalizar lípidos, y que se encuentra en la membrana limitante de los cuerpos lamelares. Las mutaciones en el gen de esta proteína que tienen como consecuencia la carencia de ABCA3 operativa causan deficiencia fatal de surfactante en los recién

nacidos, así como la ausencia de cuerpos lamelares normales y mielina tubular. Todo apunta a que esta proteína podría tener un papel fundamental en el empaquetamiento de las lamelas, así como en la ruta no vesicular de transporte de los lípidos del surfactante directamente del retículo endoplásmico al cuerpo lamelar (Takahashi et al., 2005; Stahlman et al., 2007; Perez-Gil y Weaver, 2010).

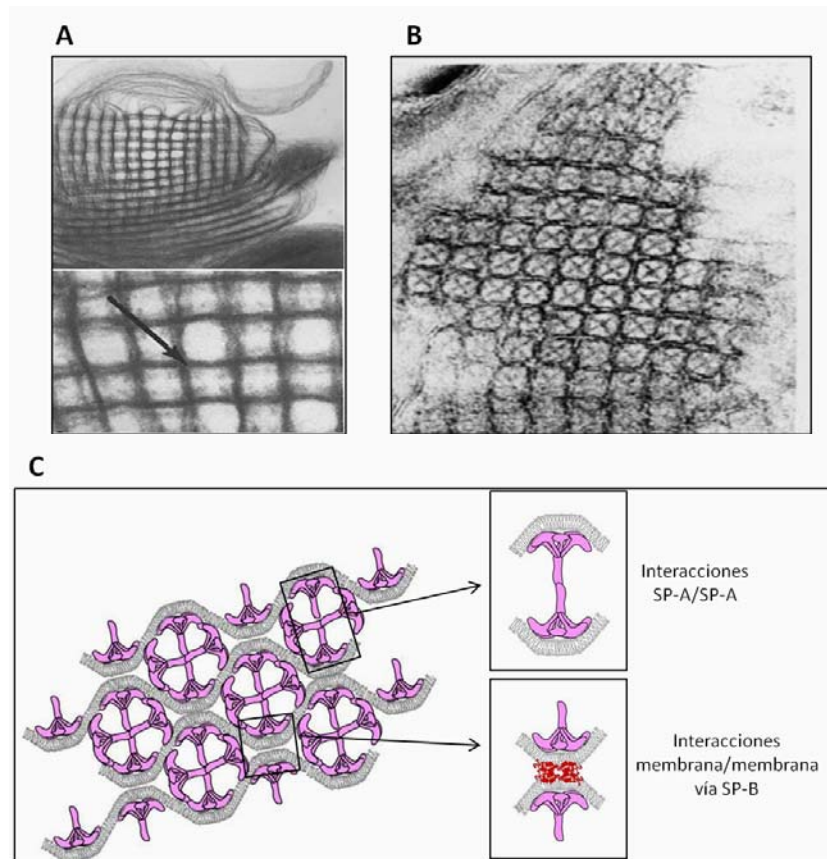
El empaquetamiento del surfactante dentro de los cuerpos lamelares en este tipo de estructuras tan densas podría tener un papel importante para favorecer una rápida adsorción del surfactante inmediatamente después de su secreción a la subfase acuosa. De hecho, el surfactante purificado a partir de lavados alveolares presenta cinéticas de adsorción inicial más lentas que los cuerpos lamelares obtenidos directamente de cultivos de neumocitos tipo II (Ravasio et al., 2010). Ello además podría presentar una ventaja frente a la inhibición por ciertos componentes plasmáticos, pues la estructura empaquetada de los cuerpos lamelares secretados podría proteger de alguna manera el material hasta que sea requerido en la interfase (Perez-Gil, 2008).

#### 1.4.3. Secreción del surfactante a la subfase acuosa

Los cuerpos lamelares son secretados por el neumocito dando lugar a una serie de estructuras extracelulares de surfactante que son de gran importancia para la correcta adsorción del material a la interfase. La alteración de las estructuras del surfactante una vez en la subfase debido a cambios en la hidratación, el pH o la concentración de calcio con respecto al ambiente de los cuerpos lamelares, podría ser importante para el conjunto de transformaciones que facilitan el tránsito del material tensioactivo desde la subfase a la interfase aire-líquido alveolar (Perez-Gil, 2008).

La principal estructura extracelular del surfactante es la **mielina tubular** (figuras 11 y 12) que constituye un 5-10% del surfactante total (Nag et al., 1999), y está compuesta de numerosos túbulos con paredes de estructura trilaminada similares a las membranas celulares, de unos 5-8.5 nm de grosor, y de sección transversal cuadrada con lados de 45-52 nm. Las imágenes de microscopía electrónica de la mielina tubular revelan una continuidad de las membranas externas de los cuerpos lamelares hasta dichas estructuras (figura 11A), es decir, que se produce una conversión directa del material empaquetado a una organización tubular en forma de red, como sugiere también la presencia de estructuras especializadas en forma de placas o de red (similar a la mielina tubular) en ciertos cuerpos lamelares una vez secretados (figura 13A) (Williams, 1977).

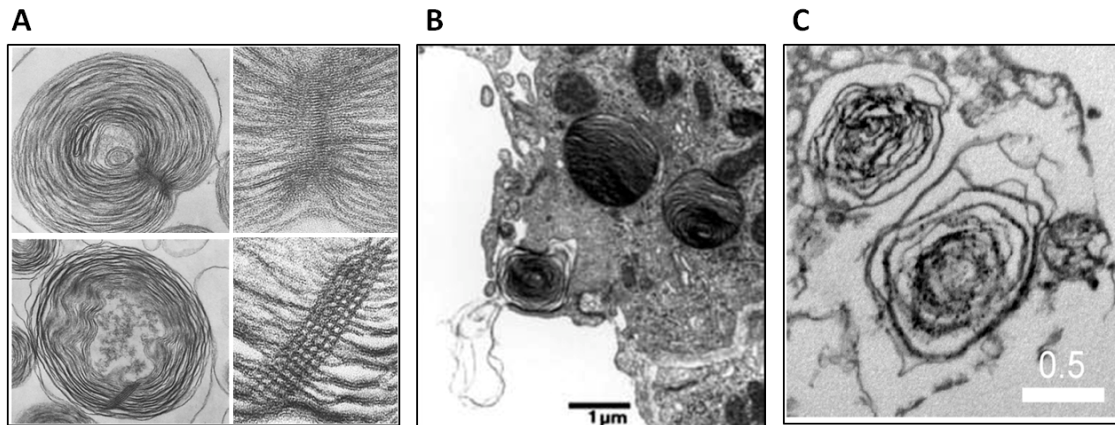




**Figura 12.** Mielina tubular. A) En la ampliación inferior la flecha señala la presencia de partículas en las esquinas de la red, que se han atribuido a la presencia de SP-A (Williams, 1977). B) Mielina tubular con estructuras proteicas en forma de cruz en el centro de los tubos (Nag et al., 1999). C) Modelo de la posible participación de las proteínas en la estructura de la mielina tubular. La SP-A induciría la formación de la red mediante interacciones proteína/proteína a través del dominio N-terminal, mientras que la SP-B facilitaría los contactos entre las membranas en las esquinas de la red (Perez-Gil, 2008).

Los componentes mínimos esenciales para la reconstitución de mielina tubular *in vitro* son DPPC, PG, SP-A, SP-B y calcio. La alteración de la SP-A (como en la proteinosis alveolar) o su ausencia (en ratones knock-out) conlleva la desaparición de esta estructura (Nag et al., 1999). La SP-A ha sido localizada mediante anticuerpos en las esquinas de la red (Voorhout et al., 1991), de manera que podría favorecer la formación de la estructura de mielina tubular contactando con las membranas por la zona de reconocimiento de carbohidratos mientras que mediante el N-terminal interaccionaría con otras moléculas de SP-A (figura 12C). En cuanto a la SP-B, podría estar mediando interacciones entre las membranas superpuestas en los cruces de la red, desconociéndose si en dichas esquinas las membranas están fusionadas o no (Perez-Gil, 2008).





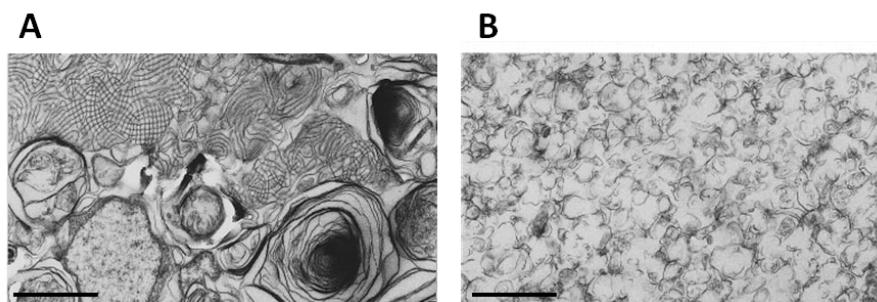
**Figura 13.** Imágenes de microscopía electrónica en las que se observan cuerpos lamelares secretados. **A)** Estructuras presentes en algunos cuerpos lamelares, en forma de placa (superior) y de red (inferior). A la derecha se muestran imágenes ampliadas de dichas estructuras (Williams, 1977). **B)** Desempaquetamiento de las membranas de surfactante al secretarse los cuerpos lamelares (Rooney et al., 1994). **C)** Cuerpos lamelares parcialmente desempaquetados una vez secretados por neumocitos tipo II en cultivo (Ravasio et al., 2010).

#### 1.4.4. Degradación y reciclaje de los componentes del surfactante

Una vez que el surfactante es secretado y se adsorbe para formar la película interfacial, los sucesivos ciclos respiratorios conllevan una pérdida parcial durante la espiración del material adsorbido a la interfase, de manera que parte de este surfactante será reciclado por los neumocitos tipo II para su reutilización, y parte será degradado por los macrófagos. De la misma manera, la SP-A puede ser internalizada por los macrófagos y degradada en los lisosomas, o bien reciclada por los neumocitos tipo II que la recapturan mediante un receptor de manera dependiente de calcio (Stevens et al., 2001). Para llevar a cabo el reciclaje de los componentes del surfactante es importante el transporte vesicular por la ruta endocítica desde los espacios alveolares a los cuerpos lamelares, convergiendo así el reciclaje con la ruta biosintética (Perez-Gil y Weaver, 2010). Por otro lado, la presencia de las proteínas SP-A, SP-B y SP-C produce un aumento de la captura de los lípidos del surfactante por los neumocitos tipo II (Weaver y Whitsett, 1991).

El material que resulta progresivamente excluido de manera permanente de la película interfacial durante los sucesivos ciclos de compresión-expansión respiratoria, se obtiene mezclado con el surfactante recién secretado cuando se purifica el material del lavado broncoalveolar. Así, a partir de los complejos de surfactante obtenidos de estos lavados pueden separarse dos subtipos o fracciones que difieren en densidad y composición lipoproteica, mediante centrifugación diferencial o mediante centrifugación en gradiente de densidad (Putman et al., 1996). El subtipo pesado, denso o LA (agregados grandes del surfactante) contiene cuerpos lamelares, mielina tubular y vesículas grandes (figura 14), y es rico en proteínas del surfactante, mientras que el subtipo ligero o SA (agregados pequeños) sólo contiene vesículas pequeñas, la mayoría

unilamelares, y pequeñas cantidades de proteína. Estos agregados pequeños proceden probablemente de la transformación extracelular de los agregados grandes, constituyendo por tanto material en ruta de degradación o de reciclaje. Debido a su diferente composición ambos subtipos se diferencian también en su actividad interfacial, constituyendo los LA la fracción realmente activa del surfactante.



**Figura 14.** Imágenes de microscopía electrónica a partir de la fracción LA de agregados grandes (A) y SA de agregados pequeños (B) obtenidas tras el fraccionamiento del surfactante mediante centrifugación diferencial. En los primeros se observa la presencia de cuerpos lamelares y mielina tubular, mientras que en los segundos sólo aparecen vesículas pequeñas. Las barras de error corresponden a 1  $\mu\text{m}$  (Putman et al., 1996).

### 1.4.5. Regulación de la síntesis y secreción del surfactante

La síntesis y secreción de los componentes del surfactante aumenta durante el último trimestre del embarazo. Durante esta fase, y en otras situaciones a lo largo de la vida, determinados estímulos afectan a alguno o ambos procesos. Además varios de estos secretagogos producen también un aumento de la recaptura por parte de los neumocitos tipo II, actuando sobre ABCA3 (Andreeva et al., 2007).

Los glucocorticoides producen un aumento de la síntesis de DPPC y proteínas hidrofóbicas del surfactante, teniendo también un efecto en la síntesis de SP-A aunque dependiendo de la dosis de glucocorticoides y del momento en el desarrollo.

Por otro lado, la elongación mecánica de los neumocitos tipo II estimula la secreción de DPPC, como ocurre por ejemplo durante la expansión de los espacios alveolares que se produce cuando se dan inspiraciones profundas, lo que puede estar también ligado al ejercicio (Massaro y Massaro, 1983; Dietl et al., 2001).

Algunos agonistas y segundos mensajeros estimulan la secreción del surfactante por los neumocitos tipo II mediante activación de proteína quinasa. Por ejemplo, el ATP extracelular es el más potente estimulador de la secreción de surfactante *in vitro*, aunque se desconocen su origen y su papel en el alveolo (Dietl et al., 2001). También el AMPc aumenta la síntesis y secreción del surfactante, incluyendo un aumento notable de la

síntesis de SP-A, de manera que también producen este efecto los agonistas alfa-adrenérgicos que actúan a través de este mensajero.

Por último cabe destacar el papel del calcio en la secreción del surfactante a través de la inducción de la fusión de los cuerpos lamelares con la membrana plasmática del neumocito, así como la implicación del citoesqueleto de dichas células en la secreción de los cuerpos lamelares (Andreeva et al., 2007).

## **1.5. Estructura y función de los componentes del surfactante pulmonar**

### **1.5.1. Fracción lipídica**

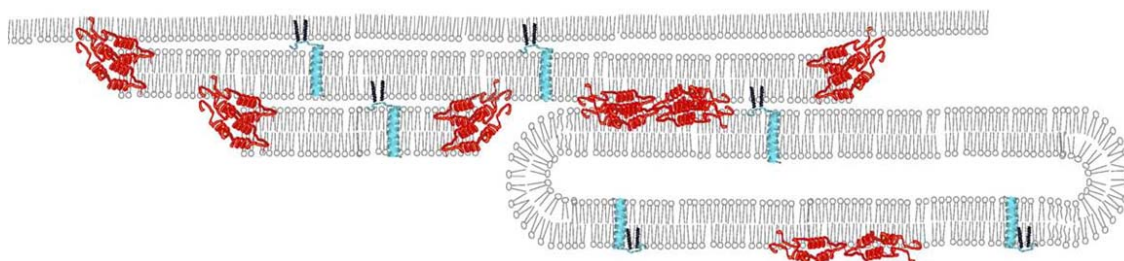
Los componentes lipídicos fundamentales del surfactante pulmonar son los fosfolípidos. Como ya se ha comentado, la especie predominante es la PC, aunque el surfactante también contiene lípidos con carga neta negativa, principalmente PG y PI, así como lípidos neutros como el colesterol. Los fosfolípidos, debido a su carácter anfipático, se organizan en medios acuosos en forma de vesículas para evitar exponer las colas hidrocarbonadas al agua, pudiendo estar las vesículas formadas por una o más bicapas lipídicas.

Las estructuras que forma el surfactante se basan, efectivamente, en organizaciones tipo bicapa. Aún así, se ha propuesto que algunas estructuras podrían contener organizaciones lipídicas no en bicapa (no lamelares) promovidas por las proteínas hidrofóbicas del surfactante, que generarían estructuras curvadas con función de puente entre las bicapas y la monocapa interfacial, pudiendo ser importantes para algunas propiedades funcionales, como la fusión de membranas o la transferencia de lípidos entre las membranas y entre éstas y la película interfacial (Piknova et al., 2002; Rugonyi et al., 2008; Chavarha et al., 2010). Las organizaciones lipídicas no lamelares se forman como consecuencia de las características geométricas de ciertos lípidos, como el colesterol o la fosfatidiletanolamina (PE). Estos lípidos poseen una forma cónica debido a sus cabezas polares pequeñas, a diferencia de los lípidos con forma cilíndrica que dan lugar a estructuras lamelares (Notter, 2000; Tolle et al., 2002).

Las bicapas lipídicas presentan diferente grado de orden y movilidad molecular en función de la temperatura y la composición lipídica concreta. Así, al alcanzar su temperatura de transición de fase ( $T_m$ ), los lípidos pasan de una fase más ordenada y sin movilidad lateral (fase gel o  $L_\beta$ ) a otra más desordenada y con mayor movilidad (fase líquido cristalina o  $L\alpha$ ). En el caso de las monocapas, la compresión de éstas produce el paso de la fase más desordenada (líquido expandida o  $L_e$ ) a la fase líquido condensada o  $L_c$ . Por otro lado, la presencia de colesterol en las estructuras lipídicas produce una fluidificación de las fases ordenadas y un ordenamiento de las fases fluidas, dando lugar a un estado líquido ordenado o  $L_o$ . Para una revisión más completa sobre las fases que pueden generar los lípidos del surfactante véase (Perez-Gil, 2008).

La temperatura de transición de fase del lípido mayoritario del surfactante pulmonar, la DPPC, es de 41°C, encontrándose por tanto en fase gel a temperaturas fisiológicas, y permitiendo así la formación de una película interfacial ordenada y estable que evite el colapso alveolar al final de la espiración. No obstante, debido a ese estado ordenado, la DPPC por sí sola no es capaz de adsorberse a la interfase, por lo que el surfactante pulmonar necesita la presencia de otros componentes que fluidifiquen el sistema y proporcionen las propiedades dinámicas indispensables para llevar a cabo su función. Para ello resulta especialmente importante la presencia de los lípidos insaturados (Johansson y Curstedt, 1997; Walters et al., 2000) y de las proteínas hidrofóbicas SP-B y SP-C (Lipp et al., 1996; Nag et al., 1996b; Johansson y Curstedt, 1997). De este modo, la composición concreta del surfactante pulmonar permite una coexistencia de fases gracias a la cual su funcionamiento es óptimo a temperaturas fisiológicas (Bernardino de la Serna et al., 2004; Bernardino de la Serna et al., 2009).

Clásicamente se ha aceptado que la capacidad del surfactante pulmonar para alcanzar tensiones superficiales cercanas a 0 mN/m durante la compresión se debe al enriquecimiento de la película interfacial en DPPC a altas presiones superficiales, principalmente logrado mediante un refinamiento selectivo en el que se excluyen los componentes fluidos de la monocapa (lípidos insaturados y proteínas). El material excluido formaría un reservorio de membranas hacia la subfase, asociado a la monocapa probablemente gracias al papel de las proteínas hidrofóbicas. El reservorio facilitaría la rápida reinserción posterior del material a la interfase durante la inspiración, y además proporcionaría estabilidad adicional a la monocapa a altas presiones (Discher et al., 1996). No obstante, el modelo más aceptado actualmente es el propuesto por Hall y colaboradores, según el cual las películas serían capaces de mantener las bajas tensiones superficiales durante la inspiración aún conteniendo lípidos fluidos (Piknova et al., 2001). De esta manera, las películas colapsarían a la tercera dimensión como una monocapa completa, y no con la exclusión selectiva de ciertos componentes, dando lugar a estructuras multicapa (figura 15) (Piknova et al., 2002; Schief et al., 2003). Además se ha propuesto que la estabilidad de esta monocapa con componentes fluidos podría estar proporcionada por la capacidad de las proteínas hidrofóbicas para distribuir uniformemente los dominios condensados en la fase desordenada (Cruz et al., 2004; Zuo et al., 2008).



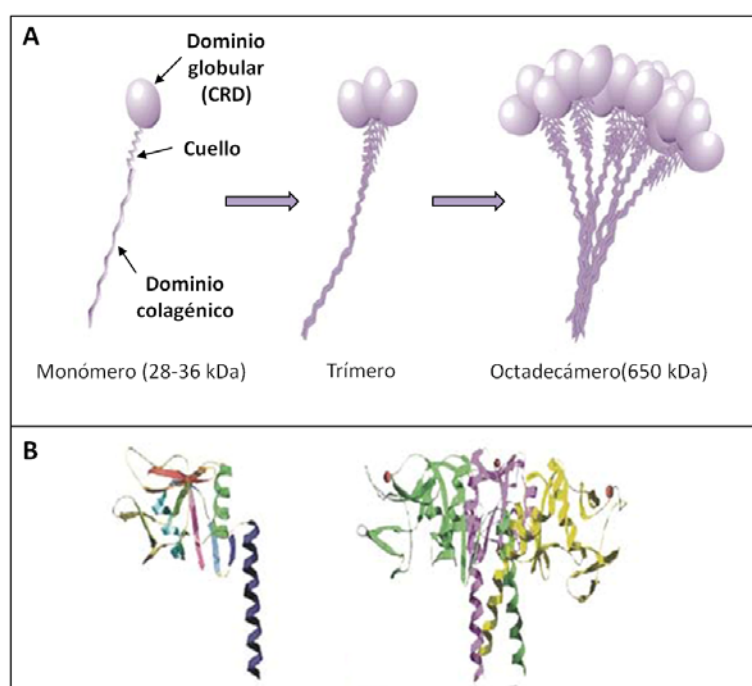
**Figura 15.** Modelo de reservorio multicapa formado por bicapas asociadas a la monocapa interfacial. En él la SP-B (en rojo) facilitaría el flujo de moléculas de lípido hacia la interfase, mientras que la SP-C (en azul) tendría un papel en mantener el reservorio asociado a la interfase (Perez-Gil, 2008).

### 1.5.2. Fracción proteica

#### Estructura y función de las proteínas hidrofílicas

##### Estructura

La SP-A es una proteína con un punto isoeléctrico (pI) de entre 4 y 5, perteneciente a la familia de las colectinas. Su monómero tiene una masa molecular de 28-36 kDa, según se encuentre modificado por 1 o 2 oligosacáridos unidos a asparagina. En la estructura de la SP-A pueden diferenciarse cuatro regiones (figura 16) (Head et al., 2003). En primer lugar, un segmento N-terminal que contiene las cisteínas que forman los puentes disulfuro que estabilizan el oligómero, y que es importante para la capacidad de la proteína de inducir agregación de vesículas. En segundo lugar una región tipo colágeno, que se prolonga con la tercera región, helicoidal, que constituye el “cuello” o “conector” de la región colagénica con la región globular. Estos segmentos helicoidales del cuello dan lugar a la formación de los trímeros de SP-A mediante una agrupación de tipo “coiled-coil”. Por último, a continuación del conector se dispone el dominio globular, que contiene el sitio de unión a carbohidratos (CRD) y dos sitios de unión a calcio. La región mediante la que la proteína se une a lípidos se ha ubicado en la confluencia entre el dominio globular y el conector coiled-coil (Casals, 2001; Wright, 2005).

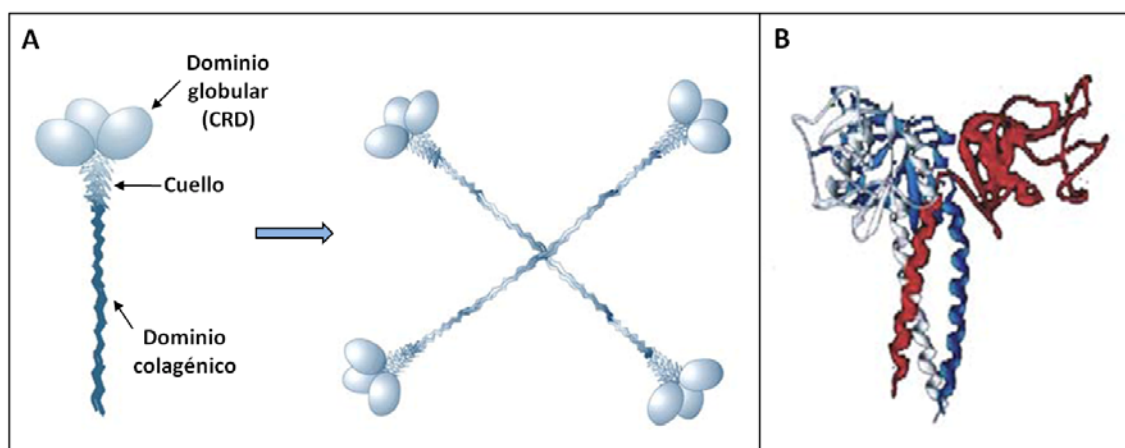


**Figura 16.** A) Modelo estructural de la forma monomérica, trimérica y octadecamérica de la SP-A. B) Estructura tridimensional de un fragmento de la SP-A de rata correspondiente a las regiones CRD y cuello, en sus formas monomérica y trimérica (Head et al., 2003).



La oligomerización de la SP-A tiene lugar en primer lugar a través de la formación de trímeros mediante las hélices en “coiled-coil” del cuello, asociándose lateralmente las 3 hélices de colágeno para constituir el tronco común de la proteína. En segundo lugar, 6 triples hélices se asocian formando un octadecámero mediante la formación de los puentes disulfuro en la región N-terminal (Haagsman, 2002).

El monómero de SP-D tiene una masa molecular de 43 kDa, y se asocia formando un dodecámero constituido por 4 trímeros dispuestos en forma cruciforme, a diferencia de la asociación paralela de los trímeros de la SP-A. También pertenece a la familia de las colectinas, siendo su estructura muy similar a la de la SP-A (figura 17). Al igual que ella, está constituida por una región N-terminal que estabiliza el oligómero mediante puentes disulfuro, un dominio colagénico, la región conectora del cuello, más largo que en el caso de la SP-A, y la región globular CRD (Haagsman et al., 2008).



**Figura 17.** A) Modelo estructural de la forma trimérica y dodecamérica de la SP-D. B) Estructura tridimensional del fragmento de la SP-D humana correspondiente a las regiones CRD y cuello del trímero (Hakansson et al., 1999).

## Función

Las actividades principales de la **SP-A** con posible significación funcional incluyen su capacidad de unión a la superficie de patógenos, su capacidad de interacción con lípidos y de una forma selectiva con DPPC, y el establecimiento de interacciones proteína-proteína, incluyendo autoasociación e interacción con las proteínas hidrofóbicas, especialmente con la SP-B.

En primer lugar, la SP-A participa en la **defensa** inmune del pulmón mediante la eliminación de microorganismos de manera directa o indirecta promoviendo la fagocitosis por parte de los macrófagos y monocitos, y además modula la inflamación pulmonar, desencadenando eventos pro y antiinflamatorios (Wright, 2005; Kuroki et al.,

2007). Para desarrollar sus actividades antimicrobianas, la SP-A parece requerir la oligomerización supratrimérica (Orgeig et al., 2010).

Su capacidad de unión a lípidos permite a la SP-A promover la agregación de vesículas lipídicas en presencia de calcio (Casals, 2001), de manera que la proteína podría mediar en los contactos bicapa-monocapa necesarios para la transferencia de material a la interfase durante la **adsorción** y durante la reextensión desde el reservorio en la inspiración. Esto, sumado a la probable interacción de la SP-A con las proteínas hidrofóbicas, puede ser importante para la potenciación por parte de la SP-A de la adsorción interfacial en presencia de SP-B (Taneva y Keough, 2000; Morrow et al., 2007). Tanto la capacidad de la SP-A para inducir la agregación de vesículas fosfolipídicas, como su capacidad para promover la adsorción de las membranas del surfactante, parecen requerir el ensamblaje supratrimérico de la proteína (Sanchez-Barbero et al., 2005).

Por otro lado, junto con la SP-B, la presencia de la SP-A es estrictamente necesaria para la **formación de la mielina tubular**, cualquiera que sea la función de esta estructura membranosa especializada (ver apartado 1.4.3, figura 12). Aunque se ha propuesto que la presencia de mielina tubular está asociada a las fracciones más tensioactivas, no hay evidencias que confirmen un papel de esta estructura en la estabilización del epitelio. De hecho, animales “knock-out” para la expresión de SP-A no tienen mielina tubular y sin embargo presentan aparentemente una función respiratoria normal (Korfhagen et al., 1996).

Finalmente, otra de las actividades importantes de la SP-A supone la **protección del surfactante frente a la inhibición** competitiva por proteínas plasmáticas, que se produce cuando hay daño agudo en el pulmón y la alteración de la barrera alveolo-capilar da lugar a extravasación de componentes plasmáticos a los espacios alveolares y edema (Holm et al., 1988; Warriner et al., 2002).

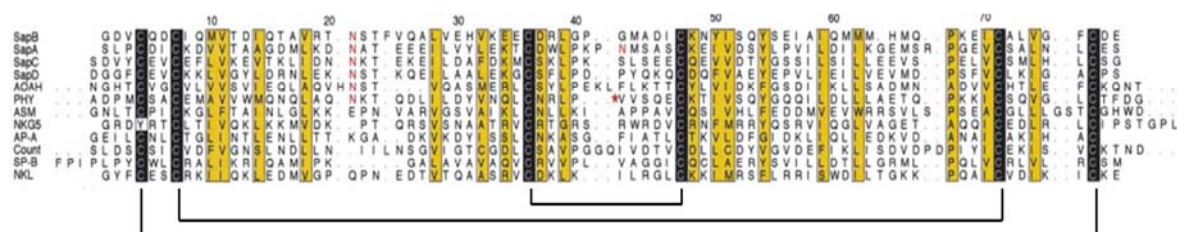
En cuanto a la **SP-D**, esta proteína forma parte, junto con la SP-A, de la **defensa** inmune del pulmón, mediante la atenuación de la inflamación y la eliminación de los patógenos del tracto respiratorio (Kuroki et al., 2007; Pastva et al., 2007). Para ello, la SP-D reconoce el LPS de las bacterias mediante su dominio CRD, produciendo la agregación de las mismas o aglutinación (Crouch y Wright, 2001).

Por otro lado, la SP-D es importante para el **mantenimiento de la homeostasis** del surfactante pulmonar. La inactivación del gen de esta proteína en ratones “knock-out” produce una acumulación de los lípidos del surfactante y una alteración de la estructura de los agregados grandes, debido a una alteración de la recaptura del surfactante por parte de los neumocitos tipo II (Ikegami et al., 2005). El efecto de la SP-D en dicha recaptura se ha atribuido a su capacidad para asociarse y lisar membranas lipídicas ricas en PI, convirtiendo estas estructuras en formas más pequeñas que facilitan la recaptura por el neumocito (Ikegami et al., 2009).

## Estructura y función de la SP-B

### Estructura común de las proteínas de la familia SAPLIP

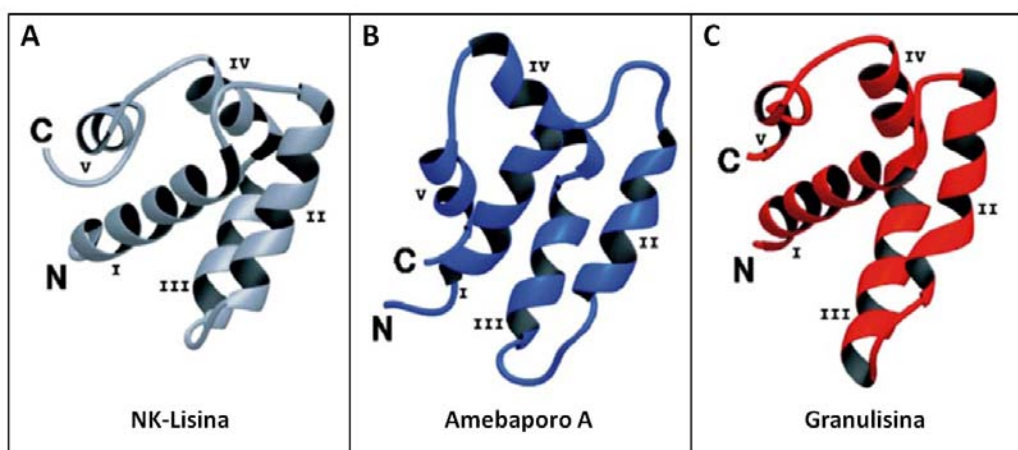
La SP-B pertenece a la familia de las proteínas tipo saposina (**SAPLIP**). Éstas son proteínas pequeñas con una secuencia caracterizada por la presencia de 6 cisteínas estrictamente conservadas y varios aminoácidos hidrofóbicos (figura 18), que les proporcionan una estructura en forma de 4 o 5 hélices anfipáticas estabilizadas por 3 puentes disulfuro intracatenarios. Esta familia incluye proteínas tales como NK-lisina, granulinsina, amebaporos A, B y C, y saposinas A, B, C y D. A pesar de las diferentes funciones que desempeñan, todas ellas comparten la capacidad de unión a lípidos (Munford et al., 1995). La estructura tridimensional de la SP-B se desconoce actualmente, por lo que su estudio se ha abordado mediante diferentes aproximaciones que incluyen la comparación con la estructura conocida de otras proteínas de la familia. Por ello, a continuación se resumen las principales características de algunas de ellas.



**Figura 18.** Alineamiento de secuencia de las proteínas pertenecientes a la familia SAPLIP: saposinas A, B, C y D (SapA, B, C, D), aciloxiacil hidrolasa (AOAH), fitepsina (PHY), esfingomielinasina ácida (ASM), granulinsina (NKG5), amebaporo A (AP-A), countinina (Count), SP-B y NK-lisina (NKL). Las posiciones están numeradas según la secuencia de la saposina B. En la parte inferior las líneas indican los puentes disulfuro. Los residuos idénticos (cisteínas) se muestran sombreados en negro, y los aminoácidos conservados en amarillo (Ahn et al., 2003).

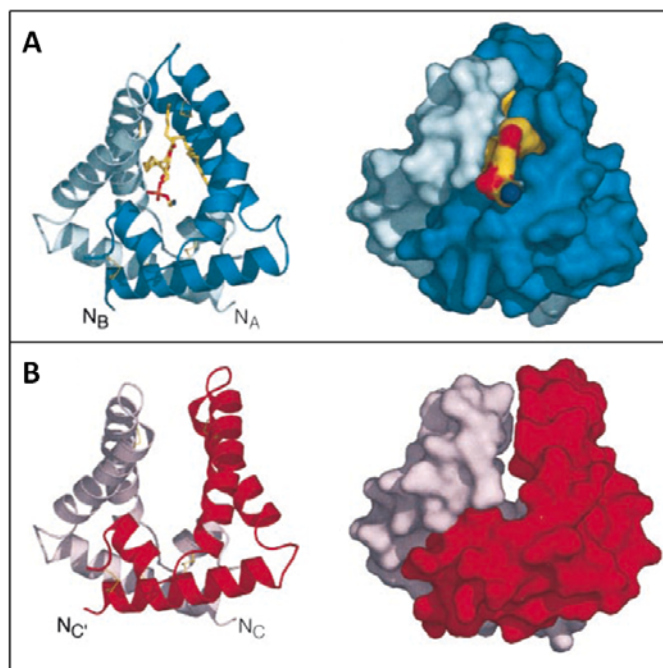
La **NK-lisina** (figura 19A) es una proteína pequeña, básica, secretada por las células “natural killer”, que posee actividad citolítica frente a bacterias y células tumorales. Fue la primera proteína de la familia SAPLIP de la que se determinó su estructura tridimensional por NMR (Liepinsh et al., 1997), y está constituida por 5  $\alpha$ -hélices anfipáticas plegadas formando un dominio globular, y 2 cavidades tapizadas con las cadenas laterales de los aminoácidos hidrofóbicos. Su interacción con la bicapa es periférica a través de su superficie cargada, por lo que, dado que no parece formar un poro integrado en la membrana, se ha propuesto que podría ejercer su función mediante electroporación molecular (Miteva et al., 1999).





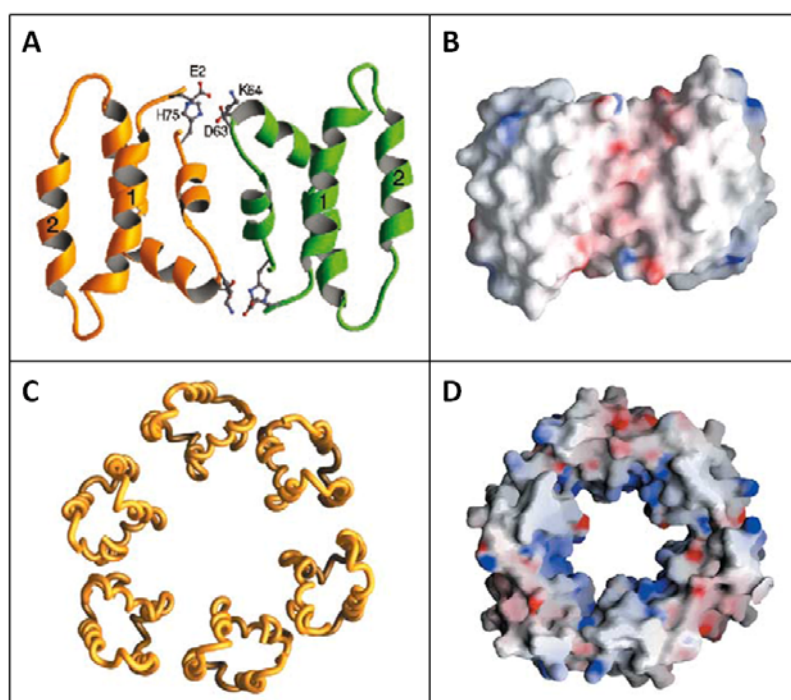
**Figura 19.** Estructura de algunas de las proteínas de la familia SAPLIP. Los números romanos corresponden a las  $\alpha$ -hélices homólogas (Hecht et al., 2004).

Las **saposinas** son proteínas lisosomales que actúan como cofactores de las hidrolasas específicas de glucoesfingolípidos. Como en el caso de la SP-B, se derivan de una proproteína de gran tamaño, la prosaposina (554 aminoácidos). Se trata de proteínas solubles que forman homodímeros y se unen a ciertos lípidos de la membrana formando un complejo soluble en agua, facilitando así el movimiento de los lípidos entre las membranas o su interacción con enzimas solubles. Las saposinas A, C y D se unen a las enzimas y su capacidad de unión a lípidos depende del pH, produciéndose un aumento de su hidrofobicidad con la acidificación en los lisosomas (Vaccaro et al., 1999). La **saposina B** sin embargo se une directamente a los sustratos lipídicos en lugar de a la propia enzima, y esta interacción con los lípidos no se ve afectada por el pH. Las dos primeras cisteínas de la saposina B forman puentes disulfuro con las dos últimas y las dos cisteínas centrales lo forman entre sí, observándose este mismo patrón en el caso de la saposina C, la NK-lisina y la SP-B (Vaccaro et al., 1995). La estructura tridimensional de la saposina B, revelada por cristalización (Ahn et al., 2003) consiste en 4 alfa hélices anfipáticas dispuestas en forma de horquilla plegada en forma de V, quedando expuesta al exterior la parte hidrofílica y escondida la zona hidrofóbica de la proteína (figura 20). Los puentes disulfuro unen las hélices 1-4 (2 puentes) y 2-3 (1 puente). Al dimerizar la proteína tendría dos conformaciones: un dímero simétrico formado por los contactos de las dos hélices N-terminal por la base y una cavidad hidrofóbica abierta hacia arriba, y un dímero asimétrico en el que la cavidad estaría cerrada, atrapando un lípido en ella.



**Figura 20.** Estructura del dímero de la saposina B obtenida mediante cristalización, en conformación cerrada (**A**) y abierta (**B**). En **A** se muestra el dímero asimétrico que encierra una molécula de fosfatidiletanolamina en el interior de la cavidad hidrofóbica, con la cabeza polar expuesta al disolvente y las cadenas de acilo secuestradas en la cavidad. En **B** se muestra el dímero simétrico (Ahn et al., 2003).

Los **amebaporos** (A-C) son proteínas del protozoo *Entamoeba histolitica*, que forman poros para permeabilizar las membranas celulares (Hecht et al., 2004). La estructura del amebaporo A se resolvió mediante NMR (figura 19B) (Leippe et al., 2005), encontrándose que a diferencia de la NK-lisina y de las saposinas, posee una superficie hidrofóbica, no cargada, y de longitud suficiente para atravesar una bicapa. Para la formación del poro es necesaria la dimerización, requerida también para la unión a la membrana, que es dependiente de pH ya que tiene lugar a través de interacciones electrostáticas. El monómero está formado por 5  $\alpha$ -hélices con un puente disulfuro uniendo las hélices 2-3 y dos puentes uniendo las hélices 1-5. Se encontraron además formas hexaméricas de la proteína cuando se encuentra asociada a membranas, de manera que se sugirió que 3 dímeros podrían formar un hexámero en una configuración en anillo con la parte hidrofóbica formando un cinturón alrededor del hexámero y un poro central hidrofílico de 2 nm de diámetro (figura 21C y D).



**Figura 21.** Modelización de la oligomerización del amebaporo A en forma de dímeros y hexámeros. En **A** se muestra una representación del dímero en el que las hélices 1 y 2 formarían la superficie hidrofóbica. En **B** se muestra el potencial electrostático de la superficie de la estructura dimérica, indicando en azul el potencial positivo, en rojo el negativo y en blanco los residuos apolares. En **C** se representa un modelo de la posible organización hexamérica de la proteína constituyendo un poro en una vista superior y en **D** el potencial electrostático del hexámero en la misma orientación (Leippe et al., 2005).

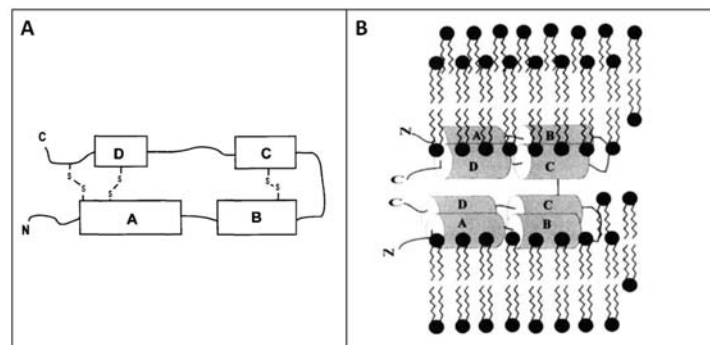
### *Estructura de la SP-B*

La **SP-B** es una proteína hidrofóbica con un alto contenido en aminoácidos hidrofóbicos, del orden del 40 %, y una alta proporción de estructura secundaria en  $\alpha$ -hélice que varía, según el ambiente, entre 27-45% (Johansson y Curstedt, 1997; Wustneck et al., 2005). Al igual que la SP-C, y al ser una proteína tan hidrofóbica, presenta migraciones electroforéticas atípicas en PAGE-SDS, probablemente debido a una unión anormal al SDS. La SP-B da lugar a una banda electroforética con movilidad correspondiente a 15-21 kDa en condiciones no reductoras, aunque la masa calculada para la forma monomérica según su secuencia de aminoácidos es de 8.7 kDa (Curstedt et al., 1987; Johansson y Curstedt, 1997).

Al igual que el resto de las proteínas SAPLIP, la SP-B contiene 6 cisteínas que forman 3 puentes disulfuro intracatenarios (Cys 8-77, Cys 11-71 y Cys 31-46). Además posee una séptima cisteína (Cys 48) que forma un puente disulfuro intermolecular que estabiliza el homodímero de SP-B. La formación de este dímero covalente, su naturaleza altamente hidrofóbica y su asociación permanente a lípidos, constituyen las diferencias esenciales entre la SP-B y el resto de proteínas de la familia SAPLIP. Como se ha comentado anteriormente, su estructura tridimensional no ha sido todavía resuelta,

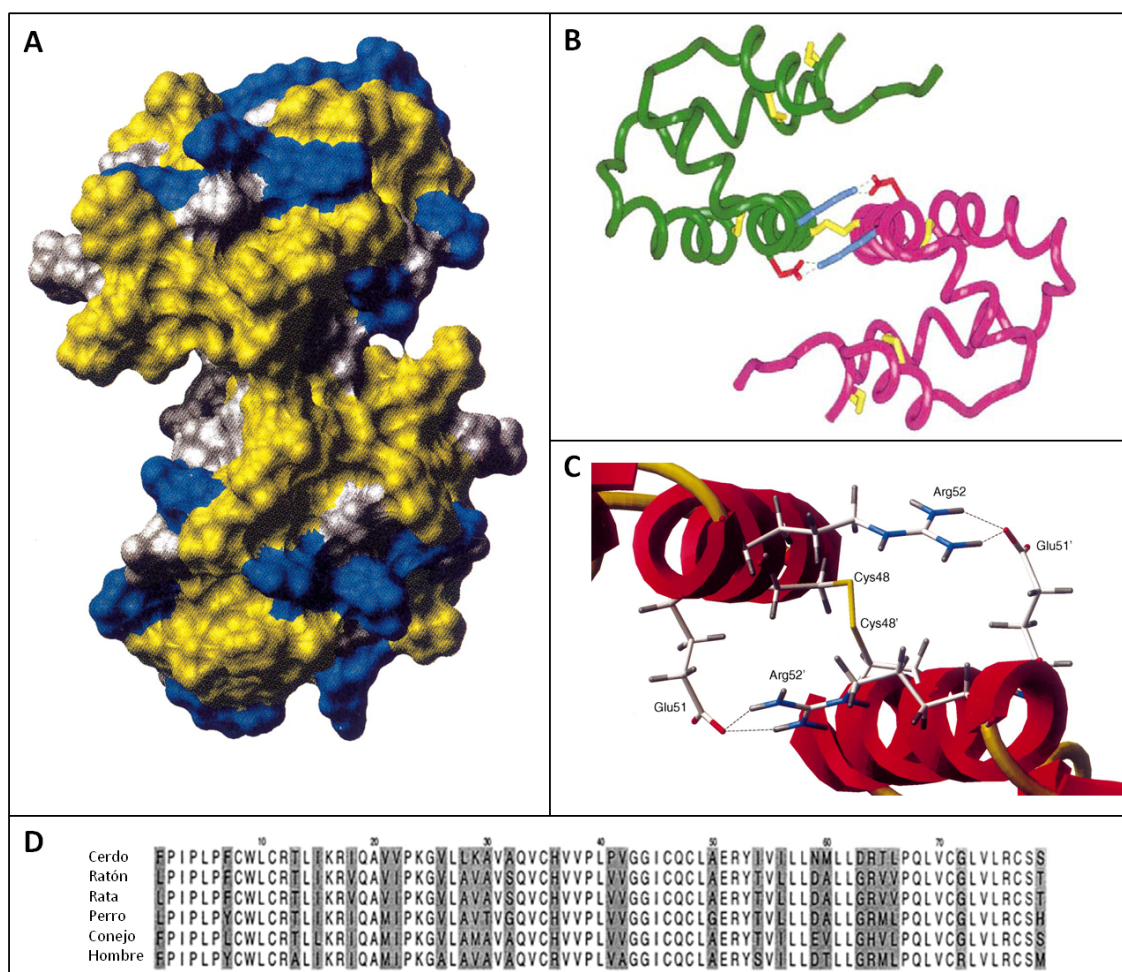
por lo que se han realizado modelos hipotéticos en función de la comparación de su secuencia aminoacídica con otras proteínas tipo saposina.

El alineamiento de las secuencias de la SP-B y NK-lisina llevó a predecir la existencia de 4 secuencias en forma de  $\alpha$ -hélices anfipáticas (8-22, 27-38, 42-50 y 67-74), lo que indicaría que la SP-B estaría plegada sobre sí misma debido al patrón de puentes disulfuro, asociándose las hélices por pares 1-4 y 2-3, de manera antiparalela, con la cisteína 48 formando el puente disulfuro en la cara hidrofílica de la hélice 3 (figura 22) (Andersson et al., 1995).



**Figura 22.** **A)** Orientación de las hélices anfipáticas (A-D) de las proteínas tipo saposina en la que se señalan los puentes disulfuro intracatenarios. En el caso de la SP-B la cisteína 48 que forma el puente intermolecular estaría situada en la cara hidrofílica de la hélice C (Andersson et al., 1995). **B)** Modelo según el cual cada monómero de SP-B se encontraría interaccionando con una bicapa diferente. Las caras hidrofóbicas de las hélices anfipáticas se asociarían a los lípidos generando una conformación extendida de la SP-B (Johansson y Curstedt, 1997).

Por otro lado, Zaltash y colaboradores propusieron un modelo alternativo para la estructura del dímero de SP-B (Zaltash et al., 2000) basándose en la estructura de la proteína NK-lisina, resuelta por NMR. En este modelo la SP-B contendría 5 alfa hélices, en lugar de 4, con las regiones hidrofóbicas de la proteína protegidas hacia el interior de la proteína, y los residuos cargados en polos opuestos (figura 23A). Los puentes disulfuro estarían formados entre las hélices 1 y 5, de los extremos N y C-terminal, y entre las hélices 2-3. En esta estructura, los residuos cargados Glu51 y Arg52 se localizarían en la interfase entre los monómeros, y podrían formar dos puentes salinos entre los dos monómeros de la SP-B (figura 23B y C). De hecho ambos residuos, especialmente el Glu51, están muy conservados entre SP-Bs de diferentes especies (figura 23D), pero no existen en las saposinas, que no forman dímeros covalentes. Otros autores han propuesto además que esta estructura globular de la SP-B podría desplegarse al producirse un aumento de la tensión superficial en la monocapa, quedando expuesta al aire la región completamente hidrofóbica que en el modelo de Zaltash estaba protegida, y que al comprimirse la monocapa sería de nuevo replegada a la forma globular del modelo (Fullagar et al., 2003).



**Figura 23.** Modelo de Zaltash para la SP-B (Zaltash et al., 2000). **A)** Representación de un dímero de SP-B en la que se muestra la polaridad superficial: los residuos cargados en azul y los residuos hidrofóbicos en amarillo. **B)** Representación del esqueleto peptídico de cada monómero (en verde y rosa), con los puentes disulfuros intra e intercatenarios en amarillo. Los dos puentes salinos entre el Glu 51 (rojo) y la Arg 52 (azul) se representan como líneas discontinuas. **C)** Detalle de la interfase de dimerización de la SP-B formada por las hélices 3 de cada monómero y estabilizada por el puente disulfuro formado por cys48/cys48' y los puentes salinos (líneas discontinuas) de los pares Glu51/Arg52' y Glu51'/Arg52. **D)** Alineación de las secuencias de SP-B de varias especies, en la que se indican en blanco los aminoácidos conservados y en gris los residuos variables.

Por otra parte, la SP-B muestra una gran tendencia a **formar oligómeros** mayores al dímero (Wustneck et al., 2003), y se ha observado la formación de agregados de SP-B en monocapas comprimidas, asociados a los límites de los dominios líquido condensados (Cruz et al., 2004). Estas observaciones sugieren la existencia de **interacciones SP-B/SP-B**, que podrían ser esenciales para la capacidad de la SP-B de promover la asociación y el estrecho empaquetamiento entre las distintas estructuras del surfactante. Estas interacciones serían necesarias también para la formación de estructuras multilamelares, que parece requerir la presencia de la SP-B en ambos lados de las membranas que se empaquetan (Cabre et al., 2009). Así mismo, cabe resaltar la

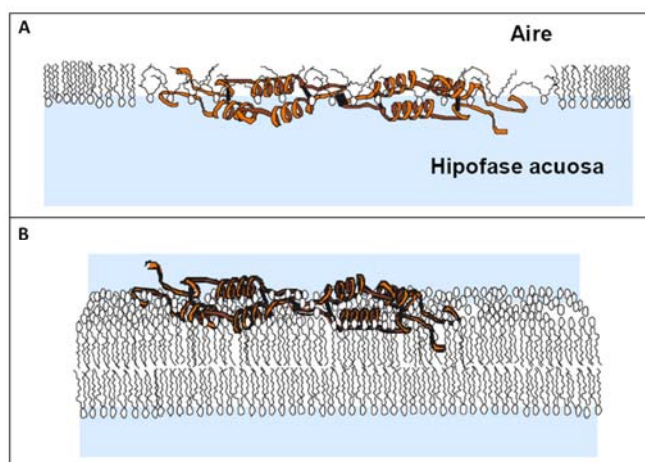


existencia de **interacciones SP-B/SP-C**, como se ha observado mediante experimentos de compresión de monocapas (Taneva y Keough, 1994) y por ensayos de apagamiento de fluorescencia y de transferencia de energía (FRET) (Jiménez Cabré, 2009).

### Interacción con membranas

Generalmente se ha considerado que la interacción de la SP-B con las membranas tiene lugar de manera superficial, aunque no está claro si también podría adoptar una disposición más profunda en la bicapa. Experimentalmente, la existencia de un tipo u otro de interacción podría depender de las condiciones de reconstitución de la proteína en complejos lipo-proteicos. Cuando la SP-B se inyecta directamente sobre vesículas lipídicas preformadas se observa una interacción más superficial de la proteína que cuando las membranas son formadas ya en presencia de la proteína (Cruz et al., 1997; Cruz et al., 1998).

Se ha propuesto que la **interacción superficial** de la SP-B con la membrana (figura 24) estaría en principio mediada por interacciones hidrofóbicas de las caras apolares de sus hélices anfipáticas con las cadenas de acilo de los lípidos, y por interacciones electrostáticas de los aminoácidos básicos del extremo N-terminal con las cabezas polares de los fosfolípidos ácidos del surfactante, principalmente PG (Johansson y Curstedt, 1997). De esta manera cada monómero podría interaccionar con una bicapa diferente, permitiendo su acercamiento, y favorecer los contactos bicapa-monocapa durante la adsorción desde la subfase y la reinserción del material desde el reservorio (Serrano y Perez-Gil, 2006). Este tipo de interacción preferencial con las regiones externas de la bicapa parece respaldado por numerosas evidencias experimentales de la alteración del orden lipídico en la superficie de la bicapa, mediante espectroscopía de resonancia magnética de deuterio (Morrow et al., 1993; Morrow et al., 2004; Morrow et al., 2007) y anisotropía de fluorescencia (Baatz et al., 1990).



**Figura 24.** Modelo de la supuesta disposición periférica de la proteína SP-B en monocapas interfaciales (A) y en bicapas lipídicas (B).

En otros trabajos se ha observado sin embargo una **interacción relativamente más profunda** de la SP-B con las membranas. Así se ha interpretado por ejemplo la perturbación por la SP-B del comportamiento termotrópico de bicapas fosfolípicas analizadas mediante experimentos de calorimetría diferencial de barrido (Shiffer et al., 1993), o la reducción de la movilidad de las cadenas de acilo causada por las interacciones lípido/SP-B detectadas mediante resonancia de espín electrónico (ESR) (Perez-Gil et al., 1995). De hecho la capacidad de la SP-B para alterar la barrera de permeabilidad de las membranas y para producir fusión de vesículas lipídicas, sugiere una penetración mayor de la proteína en las bicapas. Así, múltiples disposiciones de la proteína en la membrana son posibles, e incluso podría darse una organización del dímero de SP-B con una disposición transmembranal, tal y como sugiere el modelo propuesto por Zaltash (Zaltash et al., 2000), de manera que aunque el monómero carezca de segmentos con longitud e hidrofobicidad suficiente, el dímero podría penetrar en la membrana a través de la zona central hidrofóbica.

### *Función*

La SP-B es una proteína indispensable para la vida siendo su ausencia congénita letal (Nogee et al., 1993; Melton et al., 2003). La SP-B posee capacidades fusogénicas, membranolíticas y tensioactivas, y está involucrada en numerosas funciones a lo largo del ciclo metabólico del surfactante, que se resumen a continuación.

La SP-B es necesaria para la formación y **empaquetamiento de los cuerpos lamelares** (Foster et al., 2003) y para la **formación de la mielina tubular** (Suzuki et al., 1989), probablemente gracias a su capacidad de mediar contactos entre membranas. Además, es necesaria para el correcto **procesamiento de la pro SP-C** en los cuerpos multivesiculares (Weaver y Conkright, 2001). La implicación de la SP-B en el metabolismo y secreción del surfactante es respaldada además por los eventos observados en ausencia de la proteína: ausencia de mielina tubular y formación de un material proteico que se acumula en los espacios aéreos, conteniendo altas cantidades de SP-A y SP-C, procesamiento incompleto de la SP-C, alteración en el metabolismo de la SP-A, ausencia de fosfatidilglicerol y aumento de esfingomielina (Clark et al., 1995; Nogee, 1998; Melton et al., 2003).

Por su capacidad de perturbación del empaquetamiento lipídico, promoviendo el intercambio de fosfolípidos entre las estructuras del surfactante, la SP-B **mejora la adsorción** interfacial de fosfolípidos, siendo la proteína del surfactante más activa en este sentido (Schurch et al., 2010). Para ello es probablemente importante su capacidad para mediar contactos bicapa-monocapa (Cruz et al., 2000). Además se ha propuesto que la SP-B podría favorecer la formación de una estructura curvada intermedia entre bicapas y monocapas, por la que los lípidos podrían fluir de las vesículas a la interfase (Chavarha et al., 2010).

Una vez formada la película interfacial, la SP-B mejora la estabilidad lateral de ésta, especialmente durante las altas presiones soportadas en la espiración, permitiendo

al surfactante **alcanzar tensiones superficiales menores** que la presencia de la SP-C (Rodríguez-Capote et al., 2001; Serrano y Perez-Gil, 2006; Schurch et al., 2010). La estabilidad conferida a la película podría en parte venir dada por el papel de la SP-B en la segregación lateral de fases que se produce durante la compresión generando un mayor número de dominios de fase condensada y de menor tamaño (Cruz et al., 2004; Wustneck et al., 2005; Zuo et al., 2008).

Por último, durante la inspiración, la SP-B **facilita la reextensión** del material en la película interfacial tras el colapso (Krol et al., 2000; Serrano y Perez-Gil, 2006).

### *Identificación de motivos estructurales funcionales en la SP-B*

La existencia de tres **puentes disulfuro intracatenarios** en la SP-B es importante para proporcionar a la SP-B una estructura estable y correctamente plegada. Por ejemplo, se ha determinado que el puente intramolecular Cys31-46 es imprescindible para el correcto plegamiento y funcionalidad de la SP-B (Beck et al., 2000b). La alteración del patrón de puentes disulfuro parece perturbar de manera dramática la ruta de plegamiento de manera que las mutaciones que afectan a las cisteínas implicadas son en su mayoría letales por dar lugar en último término a ausencia completa de la proteína en las vías aéreas. Por otro lado la existencia del **puente disulfuro intermolecular** de la Cys48, que estabiliza el dímero de SP-B, no es esencial, ya que su eliminación no altera ni la formación de cuerpos lamelares, ni el procesamiento de la SP-C, ni la función antiinflamatoria de la SP-B (Beck et al., 2000a; Ikegami et al., 2002). No obstante se observa una ligera pérdida de la funcionalidad en este surfactante, manifestada como un aumento de la histéresis en los ciclos de compresión-expansión. El hecho de que estos efectos se puedan revertir, al menos *in vitro*, aumentando la concentración de proteína monomérica sugiere la existencia de una dimerización no covalente mediada presumiblemente por la formación de los **puentes salinos** entre glu51-arg52 (Zaltash et al., 2001; Serrano et al., 2005).

El mapeo de los motivos funcionalmente esenciales de la SP-B ha permitido obtener información sobre la participación de segmentos concretos de la proteína en alguna de las propiedades de ésta, así como la posibilidad de generar péptidos sintéticos basados en dichas secuencias de la SP-B. De este modo se observó que el péptido catiónico **SP-B<sub>1-25</sub>**, que posee la secuencia de los primeros 25 aminoácidos de la proteína, mimetiza la mayoría de actividades de la SP-B. Este péptido parece insertarse en las membranas de manera oblicua respecto al plano de la bicapa (Gordon et al., 1996; Kurutz y Lee, 2002), aunque parece que sólo una parte, la secuencia 7-9, estaría insertada de manera relativamente profunda, permaneciendo la hélice 10-22 en una posición superficial (Wang et al., 2003). También se han realizado estudios con el péptido **SP-B<sub>1-37</sub>**, que posee todos los determinantes necesarios para promover fusión y lisis de membrana y alcanzar y sostener bajas tensiones superficiales (Ryan et al., 2005). Este péptido está formado por un segmento N-terminal no helicoidal y las hélices 1 y 2, cuya participación en actividades SP-B miméticas ha sido analizada en detalle:



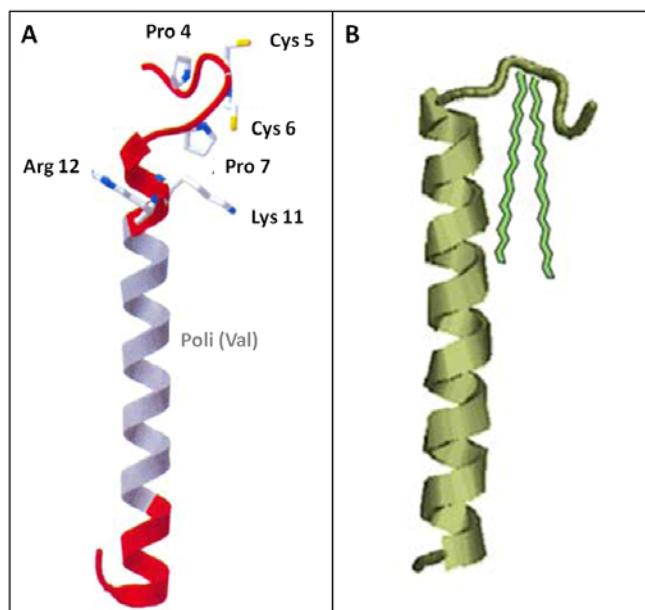
- **Segmento N-terminal** (1-9): es imprescindible para la capacidad del péptido de mantener una tensión superficial reducida pero no para la inducción de fusión o lisis de vesículas lipídicas (Kurutz y Lee, 2002; Ryan et al., 2005). Incluye el Trp 9, que parece ser imprescindible para anclar la proteína a la membrana (Serrano et al., 2006).
- **Hélice 1** (10-22): es imprescindible para disminuir la tensión superficial, para inducir la fusión de membranas y para producir la liberación de contenidos acuosos a partir de liposomas, siendo el único segmento imprescindible para esta última actividad de la SP-B. Se trata de una alfa hélice marcadamente anfipática que se asocia con la membrana mediante interacciones electrostáticas e hidrofóbicas.
- Segmento que conecta las hélices 1 y 2 (23-25): contiene una prolina que actúa de visagra. Es importante para la capacidad tensioactiva y fusogénica.
- **Hélice 2** (26-37): se trata de un segmento sustancialmente más hidrofóbico que la hélice 1 y es necesario para la disminución de la tensión superficial y para producir fusión de membranas. Presenta un cierto polimorfismo estructural, pudiendo adquirir una proporción significativa de estructura tipo  $\beta$ , y podría mediar en el acercamiento de membranas mediante interacción proteína-proteína.

## Estructura y función de la SP-C

### Estructura

La SP-C es un polipéptido muy hidrofóbico que contiene un 66% de aminoácidos hidrofóbicos. Está constituido por 35 aminoácidos, que incluyen dos cisteínas adyacentes (residuos 5 y 6) en una región con secuencia palindrómica cerca del extremo N-terminal (Ile-Pro-Cys-Cys-Pro-Val). Se trata de un lipopéptido ya que las dos cisteínas se encuentran palmitoiladas covalentemente mediante enlaces tioéster en la mayoría de las especies (figura **25B**). En la proteína canina sin embargo, la posición 6 está ocupada por una fenilalanina, estando también la única cisteína palmitoilada (Curstedt y Johansson, 2010).

La estructura tridimensional de la SP-C fue determinada por resonancia magnética nuclear (RMN) en disolvente orgánico (Johansson et al., 1994). Está formada por una región de 25 aminoácidos (residuos 9 a 34) hidrofóbicos con cadenas laterales ramificadas, principalmente valina (43%) y leucina o isoleucina (35%), que constituye una alfa hélice hidrofóbica muy estable y rígida de 3.7 nm de longitud (figura **25A**). La alfa hélice posee además de la zona polivalina (2.3 nm de longitud) un par dibásico (Lys 11 y Arg 12). El segmento N-terminal, en donde se encuentran las cisteínas 5 y 6 palmitoiladas, no presenta aparentemente una estructura definida, al menos en disolvente orgánico.



**Figura 25.** Estructura de la SP-C. **A)** Estructura tridimensional de la SP-C determinada por NMR en disolvente orgánico en la que se señalan los residuos altamente conservados entre especies (Johansson y Curstedt, 1997). **B)** Posición de las cisteínas palmitoiladas en un modelo de la SP-C obtenido a partir de la estructura tridimensional resuelta por NMR (Johansson et al., 1994).

El contenido en alfa hélice de la SP-C en ambientes lipídicos es de en torno al 70%, mientras que en la SP-C despalmitoilada es sólo del 60% (Vandenbussche et al., 1992b). Esto indica que la palmitoilación es importante para la estabilización de la conformación helicoidal de la SP-C. La pérdida de los palmíticos conlleva además a la formación de dímeros con un mayor contenido en lámina beta y peor funcionalidad (Baatz et al., 1992; Dluhy et al., 2003), así como la generación de fibras amiloides, como las encontradas en la proteinosis alveolar (Johansson, 2003). La dimerización y un aumento en el contenido en lámina beta parece estar influenciado también por el ambiente en el que se encuentra la proteína, así como por la relación SP-C/lípido (Wustneck et al., 2003).

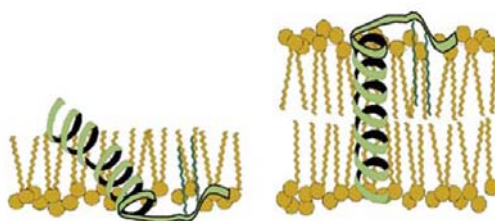
Además, estudios de resonancia magnética nuclear de la SP-C apuntan a que podría existir un sitio de dimerización que promovería interacciones hélice-hélice, y que estaría localizado en un heptapéptido muy conservado que se encuentra en el segmento C-terminal (residuos 28-34) de la  $\alpha$ -hélice hidrofóbica de la SP-C (Kairys et al., 2004; Luy et al., 2004).

#### *Interacción con membranas*

La orientación de la alfa hélice cuando la SP-C se reconstituye en bicapas lipídicas, tal y como se ha determinado por espectroscopía de infrarrojos (FTIR), es predominantemente paralela a las cadenas de acilo de los lípidos, es decir, que la proteína posee una orientación transmembrana (Vandenbussche et al., 1992b). Además,

la longitud de la alfa hélice (3.7 nm) y de su región de polivalinas (2.3 nm) sugiere la integración de la proteína en bicapas fluidas de DPPC de un grosor total de 3.7 nm, teniendo la región hidrocarbonada un grosor de 2.6 nm. Esta característica estructural explicaría las observaciones de la exclusión de la SP-C de las regiones tipo gel de la membrana, que poseen un grosor de 3.9 nm sólo en su parte hidrocarbonada (Johansson y Curstedt, 1997). También debido a la longitud de la alfa hélice, la SP-C adoptaría en monocapas una inclinación de 70° (figura 26) (Gericke et al., 1997).

La disposición del extremo N-terminal permitiría además la inserción de las palmitoilaciones de las cisteínas en la bicapa. De esta manera, los aminoácidos básicos cercanos al extremo N-terminal (lisina 11 y arginina 12) estarían situados cerca de las cabezas de los fosfolípidos, y junto con la palmitoilación de las cisteínas restringirían los movimientos laterales y la flexibilidad del segmento N-terminal en la bicapa, mientras que el C-terminal, con aminoácidos con cadenas pequeñas, tendría mayor capacidad de movimiento (Johansson y Curstedt, 1997; Mulugeta y Beers, 2003). El anclaje de las palmitoilaciones podría ocurrir en la misma bicapa en la que se encuentre insertada la alfa hélice o en otra bicapa o monocapa (Na Nakorn et al., 2007).



**Figura 26.** Modelo propuesto de inserción de la SP-C en monocapas y bicapas.

### *Función*

A continuación se describen las actividades de la SP-C relacionadas con la función del surfactante, que se han propuesto teniendo en cuenta su capacidad de interacción con los lípidos y su disposición transmembrana en las bicapas, incluyendo el anclaje a través de las cisteínas palmitoiladas.

La SP-C mejora **la adsorción interfacial de los fosfolípidos** (Nag et al., 1996a; Schurch et al., 2010). Debido a su disposición transmembranal la SP-C perturba el empaquetamiento lipídico de las membranas (Nag et al., 1996a; Nag et al., 1997), lo que podría estar relacionado con su capacidad para favorecer la transferencia de los lípidos a la interfase. De hecho, la SP-C favorece el intercambio de lípidos entre bicapas y monocapas, y la inserción de fosfolípidos en las películas interfaciales (Perez-Gil, 2001). Al igual que la SP-B, la SP-C podría contribuir además a facilitar la formación de los intermedios necesarios para la fusión entre bicapas y monocapas (Chavarha et al., 2010).

Además, la SP-C parece ser importante para **mantener asociado el reservorio de surfactante a la interfase**, lo que estabiliza la película interfacial sometida a ciclos de compresión-expansión dinámica, disminuyendo la histéresis o pérdida de material en los sucesivos ciclos respiratorios. La proteína permitiría la reextensión de la película durante la inspiración, y, a través del mantenimiento de la integridad del reservorio, proporcionaría una mayor estabilidad durante la espiración, lo que explicaría que su ausencia produzca a largo plazo alteraciones debidas a una estabilidad reducida, tales como el enfisema pulmonar (Glasser et al., 2003). Para llevar a cabo esta función parece especialmente importante la palmitoilación de la SP-C (Veldhuizen et al., 1998), que podría mantener asociado el extremo N-terminal a la interfase durante la exclusión de la alfa hélice al reservorio durante la espiración (Gonzalez-Horta et al., 2008; Plasencia et al., 2008).

Por otro lado, se ha propuesto que la SP-C podría interaccionar con el colesterol (Taneva y Keough, 1997), **mejorando las propiedades dinámicas de las películas en presencia del estero**l, de manera que no pierdan su estabilidad mecánica a elevadas presiones superficiales a pesar del efecto fluidizante del colesterol (Gomez-Gil et al., 2009). Esta actividad parece requerir de manera crítica la palmitoilación (Baumgart et al., 2010).

Finalmente, la SP-C interviene en el metabolismo del surfactante pulmonar promoviendo la recaptura de los fosfolípidos por los neumocitos tipo II. (Weaver y Whitsett, 1991)

### **1.6. El surfactante pulmonar en las patologías respiratorias y los surfactantes exógenos**

El surfactante pulmonar puede resultar alterado como consecuencia de los procesos inflamatorios que acompañan al daño pulmonar agudo. A su vez la propia deficiencia o alteración del surfactante puede ser causa de inflamación y disfunción respiratoria debido a la pérdida de las propiedades tensioactivas, anti-inflamatorias, y antipatogénicas del surfactante.

#### **Síndrome de distrés respiratorio del neonato (RDS, NRDS o IRDS)**

En 1957, mediante ensayos de evaluación de la tensión superficial en balanzas de Langmuir, Clements comprobó la existencia de una sustancia tensioactiva en los lavados broncoalveolares. En 1959 Mary Ellen Avery descubrió que los niños prematuros que morían como consecuencia de distrés respiratorio carecían de dicha sustancia (Possmayer et al., 2001).

El IRDS afecta al 10% de los niños prematuros en los países desarrollados, y se produce con frecuencia en los niños nacidos antes de las 29 semanas gestacionales como consecuencia de la deficiencia en surfactante pulmonar (Meyer y Zimmerman, 2002). Se caracteriza principalmente por:

- Una disminución de la cantidad de fosfolípidos totales, especialmente de PG (Obladen et al., 1983).
- Una disminución de la cantidad de SP-A, SP-B y SP-C, y como consecuencia de ello ausencia de mielina tubular (Weaver y Whitsett, 1991).
- El aumento de la tensión superficial mínima.

### **Síndrome de distrés respiratorio agudo (ARDS)**

El ARDS es una forma severa de daño pulmonar agudo (ALI) que describe una reacción inflamatoria generalizada en el pulmón, como consecuencia de un ataque directo en el parénquima o de procesos infecciosos como la sepsis (Zuo et al., 2008).

Clínicamente, el ARDS va acompañado de un aumento de la permeabilidad alveolo-capilar que conlleva liberación de proteínas del plasma y edema en los espacios alveolares. La consecuencia inmediata es la inactivación del surfactante, la atelectasia por aumento de la tensión superficial mínima durante la espiración a valores de hasta 15-20 mN/m y la alteración del intercambio gaseoso. Estas alteraciones se ven además agravadas por la fibrosis pulmonar generada como consecuencia de un aumento de la matriz de colágeno en el espacio alveolar (Gunther et al., 2001).

Como consecuencia de estos procesos inflamatorios, durante el ARDS se producen una serie de alteraciones en el surfactante pulmonar (Veldhuizen et al., 1998; Gunther et al., 2001; Meyer y Zimmerman, 2002):

1. Alteración del perfil de los lípidos del surfactante:
  - Disminución de los fosfolípidos totales.
  - Disminución del contenido de DPPC.
  - Disminución de la cantidad de PG y aumento de los fosfolípidos minoritarios (PI, PS, PE, SM), lo que se traduce en un aumento de la relación PI/PG.
  - Aumento de la cantidad de colesterol desde un 5% (p/p) en el surfactante normal a proporciones del 20% cuando existe daño pulmonar agudo (Panda et al., 2004; Gunasekara et al., 2005; Zuo et al., 2008).
2. Disminución de las proteínas del surfactante (SP-A, SP-B y SP-C).
3. Alteración del metabolismo del surfactante debido al daño causado en los neumocitos tipo II por los mediadores inflamatorios liberados, lo que conlleva una disminución de la fracción activa de surfactante (LA) y un aumento de los agregados pequeños (SA). Esta variación en la relación LA/SA ocurre como consecuencia de una disminución de la síntesis y secreción del surfactante y un aumento de la degradación de LA.
4. Aumento de las proteínas séricas asociadas con los LA por la alteración de la barrera alveolo-capilar (Panda et al., 2004).

Como consecuencia de todas estas alteraciones, se produce una **inhibición del surfactante** asociada al ARDS, que se manifiesta como una disminución de su adsorción, de su capacidad para disminuir la tensión superficial o de la capacidad de re-extensión tras la espiración (Zuo et al., 2008). Esta inhibición es producida por los siguientes componentes, que llegan al surfactante como consecuencia del daño:

- Proteínas plasmáticas como la albúmina, el fibrinógeno o la hemoglobina en elevadas cantidades. Se trata de agentes que compiten por la interfase aire-agua, y al ser solubles llegan antes a ella que el surfactante. Se trata por tanto de una inhibición competitiva, y es disminuida por la presencia de la SP-A y por el aumento de la concentración de surfactante (Holm et al., 1988; Warriner et al., 2002).
- Fosfolípidos insaturados, lisofosfolípidos y ácidos grasos libres.
- Niveles suprafisiológicos de colesterol.
- Meconio (heces fetales producidas durante estrés prenatal): sus ácidos biliares actúan como detergentes (Lopez-Rodriguez et al., 2011).
- Mediadores pro-inflamatorios como radicales libres de oxígeno, proteasas o fosfolipasas (Meyer y Zimmerman, 2002).

### Surfactantes exógenos

En 1980 se empezó a tratar a los niños enfermos de IRDS con preparaciones de surfactantes obtenidas de vaca o de cerdo. Estos surfactantes son obtenidos mediante extracción orgánica, por lo que sólo contienen los lípidos y las proteínas hidrofóbicas. Además, las modificaciones que sufren estas preparaciones durante el proceso de elaboración conllevan la pérdida de ciertos componentes, por lo que su funcionalidad no es tan buena como la de los surfactantes nativos enteros. Posteriormente, y para evitar potenciales contaminaciones virales y respuestas inmunológicas hacia los productos derivados de animales, han aparecido también preparaciones sintéticas. Éstas pueden consistir exclusivamente en fosfolípidos y aditivos que favorecen su actividad tensioactiva, como el Exosurf, en cuyo caso tienen muy baja eficacia, o contener péptidos simplificados o análogos recombinantes de las proteínas (Mingarro et al., 2008; Zuo et al., 2008). Cabe resaltar que, a pesar de los constantes intentos por mejorar las propiedades de todos estos surfactantes exógenos, no existe ninguno a día de hoy que muestre una funcionalidad próxima a la del surfactante nativo, del que todavía existen muchos aspectos por caracterizar en detalle, incluyendo el papel que juegan muchos de sus componentes y las interacciones moleculares que lo soportan.

#### Surfactantes exógenos naturales

Los surfactantes obtenidos de fuentes animales pueden proceder de lavados broncoalveolares (LBA) o de trozos de pulmones (siendo los primeros más resistentes a la inactivación por proteínas plasmáticas). Se diferencian en la composición de fosfolípidos, colesterol, proteínas hidrofóbicas y aditivos añadidos durante su

elaboración (Zuo et al., 2008). Los principales surfactantes naturales utilizados en clínica son los siguientes (Blanco y Perez-Gil, 2007):

1. *Curosurf*: es el surfactante clínico utilizado mayoritariamente en Europa. Se obtiene mediante extracción orgánica de pulmón porcino troceado y posterior eliminación del colesterol por cromatografía. En comparación con el surfactante nativo entero contiene aproximadamente sólo 1/3 de la SP-B y 1/2 de la SP-C original.
2. *Survanta*: surfactante clínico utilizado sobre todo en Estados Unidos. Se obtiene mediante extracción orgánica de trozos de pulmón bovino, carece de colesterol y es suplementado con DPPC, triglicéridos y ácido palmítico, lo que le confiere una elevada viscosidad que dificulta su administración. En comparación con el surfactante nativo, contiene sólo aproximadamente 1/8 de SP-B y 1/2 de SP-C.
3. *Infasurf*: obtenido mediante extracción orgánica de lavado broncoalveolar (LBA) bovino, contiene colesterol y una alta cantidad de SP-B.
4. *Surfactén*: surfactante clínico utilizado en Cuba. Obtenido mediante extracto orgánico de LBA porcino al que se le elimina el colesterol mediante precipitación con acetona, aunque su composición lipídica y proteica es más próxima a la natural que la de Survanta.

#### Surfactantes sintéticos con análogos de las proteínas hidrofóbicas

Los principales surfactantes clínicos sintéticos, aún en desarrollo, son los siguientes:

1. *Venticute*: contiene una forma recombinante de la SP-C humana (Spragg et al., 2003).
2. *Surfaxin*: contiene el péptido sintético KL<sub>4</sub> (Wiswell et al., 1999). Se trata de un péptido pequeño anfipático consistente en una secuencia de leucinas interrumpida por una lisina cada 5 residuos. Su diseño se basó en un segmento helicoidal con carga positiva de la SP-B (Cochrane y Revak, 1991). Algunos resultados experimentales sugieren que este péptido podría parecerse más a la SP-C que a la SP-B en algunos ambientes lipídicos surfactante-miméticos, en los que adopta una orientación transmembranal (Gustafsson et al., 1996; Martinez-Gil et al., 2008).

Finalmente cabe resaltar que el tratamiento con surfactante ha resultado ser efectivo esencialmente en el tratamiento del IRDS. Su aplicación en casos de ARDS y ALI no ha producido resultados tan claros, probablemente debido a la complejidad de los procesos inflamatorios asociados con dichas alteraciones. Por ello, y para reducir el problema de la inhibición del surfactante en ARDS, se ha propuesto que el tratamiento con surfactante requerirá una mayor optimización del contenido en lípidos y proteínas, incluyendo un aumento de la concentración de fosfolípidos, la posible adición complementaria de lípidos sintéticos, la adición de polipéptidos análogos de la SP-B y SP-C o de algunos de sus motivos estructurales funcionalmente importantes o la adición

de SP-A. También se ha ensayado la mayor resistencia a inhibición resultante de la adición de polímeros solubles, como dextranos, polietilenglicol o ácido hialurónico, como aditivos del surfactante que favorecen la adsorción y contrarrestan la inactivación por proteínas plasmáticas y meconio (Taeusch et al., 2005).

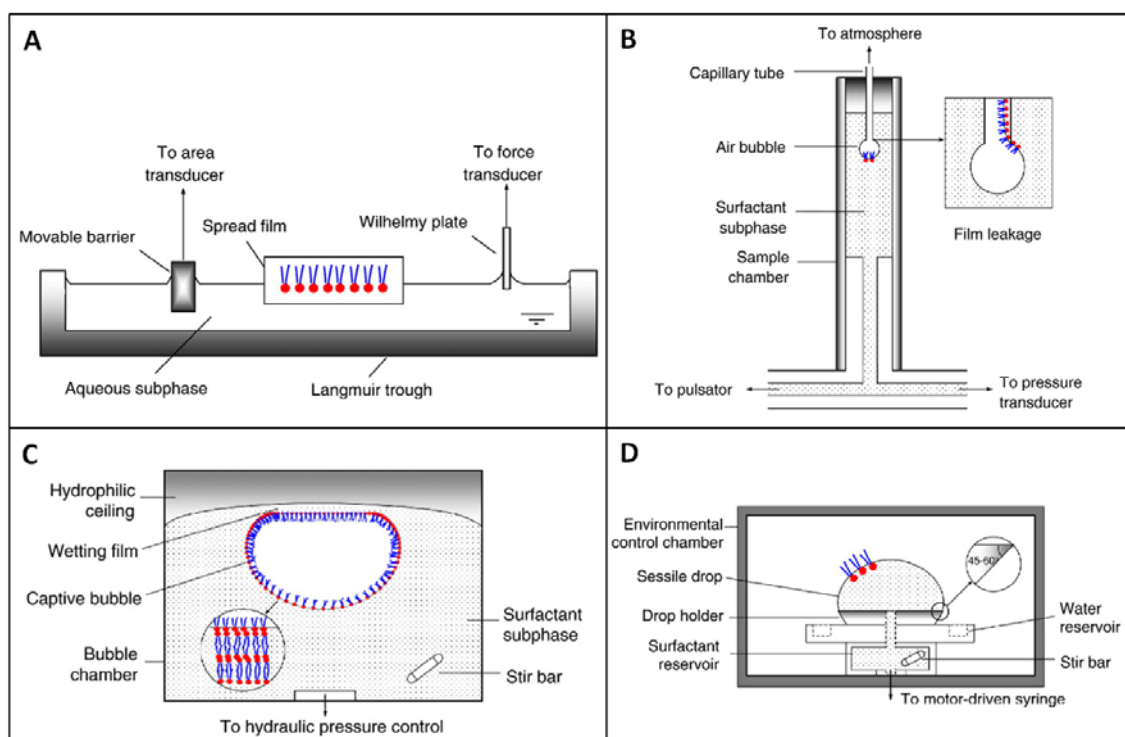
### **1.7. Técnicas para el estudio de la función tensioactiva del surfactante pulmonar**

Para estudiar in vitro la funcionalidad del surfactante pulmonar o de sus componentes, existen diferentes métodos que permiten determinar parámetros importantes que definen la actividad interfacial de los complejos lipídicos y lipoproteicos (Veldhuizen et al., 1998; Zuo et al., 2008).

#### Balanza de superficies Langmuir-Wilhelmy

Esta técnica fue utilizada por primera vez por Clements en 1957, quién observó que las películas interfaciales formadas por el material obtenido de lavados alveolares de animales producían una disminución de la tensión superficial al comprimirse. Estos experimentos parten de la formación de una película de surfactante sobre la superficie de una subfase acuosa, y su compresión y expansión mediante el movimiento de unas barreras (figura 27A), para obtener isothermas de presión superficial-área. Además, esta técnica se puede combinar con equipos de microscopía que proporcionan información sobre la organización y la distribución lateral de fases lipídicas y de proteínas en la interfase. Esta técnica tiene como principales inconvenientes la dificultad en muchos casos para impedir la pérdida de material (“*leakage*”) como consecuencia de la expulsión del área de confinamiento que se produce durante la compresión a altas presiones superficiales, y la imposibilidad para simular condiciones fisiológicas de temperatura, velocidad de compresión o elevada humedad.





**Figura 27.** Esquemas de los diversos equipos utilizados para la evaluación *in vitro* de la actividad del surfactante pulmonar. **A)** Balanza Langmuir-Wilhelmy aplicada al estudio de películas de surfactante formadas depositando el material en la superficie de la subfase acuosa. Se registran los cambios de presión superficial al reducir o aumentar el área de la interfase mediante el movimiento de la barrera. **B)** Surfactómetro de burbuja pulsátil. El surfactante se adsorbe a la interfase aire-líquido de una burbuja de aire formada en el extremo de un capilar, que luego es sometida a compresión-expansión a una velocidad del orden de 20 ciclos/minuto. Un problema de esta técnica es que puede existir pérdida de material hacia el capilar. **C)** Surfactómetro de burbuja cautiva. La burbuja de aire flota en este caso contra un techo formado por un tapón hidrofílico, pero queda separada de éste por una fina película acuosa capilar, evitando la pérdida de material. **D)** Gota sésil restringida. La gota se forma en un pedestal que posee una forma especial que previene el *leakage* y que permite el cambio cíclico de área mediante el movimiento de líquido de la subfase dentro y fuera de la gota (Zuo et al., 2008).

### Surfactómetro de burbuja pulsátil (PBS)

Consiste en formar una burbuja de aire en el interior de una cámara desechable de poliacrilamida, a través de un capilar abierto a la atmósfera (figura 27B). La tensión superficial es calculada en función del radio y el gradiente de presión a través de la burbuja esférica, cuya área se puede variar insuflando aire a través del capilar. Sus ventajas son el uso de una mínima cantidad de muestra y un tiempo de ensayo mínimo, aunque también existe el problema de posibles pérdidas del material de la burbuja hacia el capilar.

### Surfactómetro de burbuja cautiva (CBS)

En este caso la burbuja de aire, continua y cerrada, flota contra un techo hidrofílico de agarosa, por lo que no existe la posibilidad de pérdidas de material (figura 27C). La muestra se inyecta en la subfase, permitiendo que parte del material se adsorba

a la interfase aire-líquido de la burbuja, o se aplica a una elevada concentración directamente en la superficie de la burbuja. El experimento es llevado a cabo en el interior de una cámara en la que las condiciones ambientales están controladas. El volumen de la burbuja es controlado por las variaciones de presión en el interior de la cámara producidas por el movimiento de un émbolo. Al reducir el volumen de la burbuja se reduce el área de la misma lo que hace que en presencia de surfactante la tensión superficial disminuya, provocando un cambio en la forma de la burbuja de esférica a aplanada. La determinación de la tensión superficial se realiza a partir del análisis de la forma de la burbuja, bien su relación altura/diámetro, o mediante el análisis axisimétrico de la forma de la burbuja (ADSA), que compara los perfiles experimentales de la relación altura/diámetro de la burbuja con las curvas teóricas según la ley de Laplace. Este método permite la realización de ciclos de compresión/expansión cuasiestáticos o dinámicos, sin tiempos de espera entre los ciclos y sin que se produzca pérdida de material a bajas tensiones superficiales. Su único inconveniente es que la obtención de las isothermas requiere un volumen importante de procesamiento de datos una vez finalizados los experimentos.

### Gota sésil restringida (CSD)

Este método consiste en formar una gota de subfase sobre un pedestal con esquinas afiladas que previenen su extensión, lo que en principio también impide la pérdida de material a altas presiones. El experimento tiene también lugar en una cámara con condiciones controladas (figura 27D). El pedestal tiene un agujero central a través del cual la gota está conectada a un reservorio de surfactante en agitación que es absorbido a la superficie de la gota. La tensión superficial se calcula mediante análisis axisimétrico de la forma de la gota.

## **1.8. Empleo de detergentes para la solubilización de proteínas de membrana**

Numerosas técnicas biofísicas son incompatibles con el ambiente nativo complejo de las proteínas de membrana, por lo que en la mayoría de los casos se requiere la extracción de la proteína para ser estudiada en un ambiente más sencillo, que mantenga a la proteína en un estado plegado y funcional.

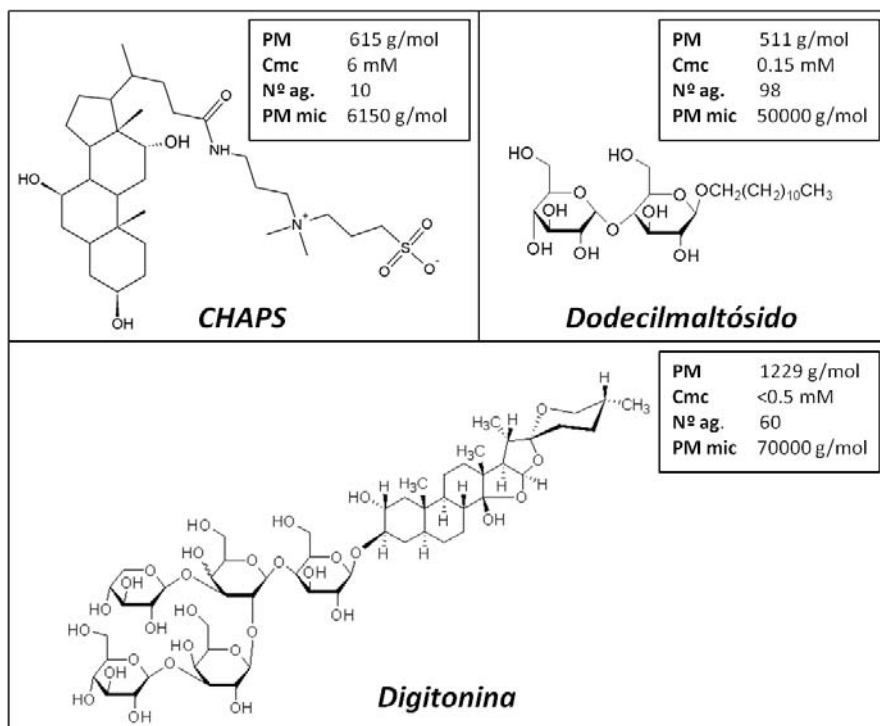
Los detergentes son moléculas anfipáticas que en ambientes acuosos se organizan en estructuras más o menos esféricas llamadas micelas, que poseen un núcleo hidrofóbico y una envuelta de grupos polares expuestos a la interfase con el agua. Al mimetizar de alguna manera el ambiente lipídico, los detergentes pueden solubilizar las proteínas de membrana, de manera que las regiones hidrofóbicas de dichas proteínas, que generalmente interaccionan con los lípidos de la membrana, se rodean por una capa de moléculas de detergente, mientras las porciones hidrofílicas pueden permanecer expuestas al medio acuoso, estabilizando las proteínas de membrana en solución (Garavito y Ferguson-Miller, 2001).

Las propiedades básicas que definen la acción de los detergentes son la concentración micelar crítica y el número de agregación (Silvius, 1992). La **concentración micelar crítica** (cmc) es la concentración de detergente a la que la solución se satura con especies monoméricas y por encima de la cual las micelas aparecen en coexistencia con los monómeros. En realidad la cmc es un rango de concentración, no un valor preciso, y se ve influenciada por el pH, la fuerza iónica (sólo en el caso de los detergentes cargados) y la temperatura. A temperaturas bajas, los detergentes pueden formar precipitados insolubles en lugar de dispersiones micelares, existiendo una temperatura, llamada punto de Kraft, en la que pueden coexistir las 3 fases, cristalina, monomérica y micelar, en equilibrio (Garavito y Ferguson-Miller, 2001). El número de agregación es el número de monómeros en la micela, y determina su forma y geometría. Generalmente se encuentra entre 10-100 monómeros.

Basándose en la naturaleza de la cabeza hidrofílica existen diferentes tipos de detergentes (Garavito y Ferguson-Miller, 2001):

1. Iónicos: con carga negativa o positiva. Un ejemplo es el SDS. Su tamaño micelar depende de las sales presentes en el medio.
2. No iónicos: No poseen carga y son más suaves que los iónicos, rompiendo fundamentalmente interacciones lípido-lípido o lípido-proteína en lugar de proteína-proteína. Se trata de detergentes no desnaturalizantes. Pertenecen a este grupo de detergentes el **dodecilmaltósido** (DDM) y la **digitonina**.
3. Zwitteriónicos, como el **CHAPS**. No tienen carga neta y no son desnaturalizantes. Suelen poseer cmc altas por lo que se eliminan más fácilmente por diálisis. La cmc del CHAPS varía poco con la temperatura y por la fuerza iónica, aunque el tamaño de las micelas aumenta al aumentar la concentración de sales (Schurholz et al., 1992).

Además se ha encontrado que los detergentes con porciones apolares relativamente rígidas, como el CHAPS (figura 28), resultan más benignos que aquellos con cadenas hidrocarbonadas flexibles, porque los primeros se asocian menos a la superficie de la proteína, rompiendo menos interacciones proteína-proteína (Silvius, 1992).



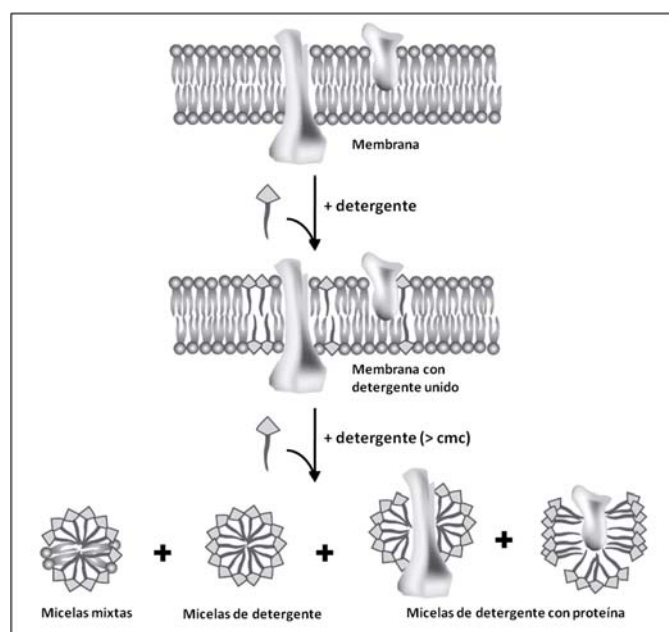
**Figura 28.** Estructura y características principales de los detergentes utilizados en la presente Tesis. PM es peso molecular, Cmc es la concentración micelar crítica (en agua a 20-25°C), Nº ag. es el número de agregación y PM mic es el tamaño de las micelas.

La **solubilización mediante detergentes de bicapas lipídicas** depende de la relación detergente no monomérico (intercalado en la bicapa o formando micelas)/lípidos de membrana. En el caso de la solubilización de una membrana formada por un solo lípido, el proceso idealizado de solubilización al aumentar la concentración de detergente pasa por tres fases (Silvius, 1992; Schurholz, 1996):

- Fase I: se produce un aumento de la concentración de detergente monomérico y un aumento de la fracción de **detergente unido en la bicapa**. Aún no aparecen micelas, y por tanto todavía no ha comenzado la solubilización de la membrana.
- Fase II: al aumentar la concentración de detergente comienza la solubilización. Aparecen **micelas mixtas** (de detergente y lípidos), que coexisten con las vesículas lipídicas y aumenta la fracción de lípido solubilizado, mientras que la concentración de detergente monomérico se mantiene constante.
  - Fase III: al aumentar aún más la concentración de detergente el lípido es **completamente solubilizado en micelas mixtas**. La fracción de lípido solubilizada se mantiene por tanto constante, mientras que aumenta la fracción de detergente en las micelas.

La concentración mínima de detergente requerida para romper una membrana a una dispersión predominantemente micelar se denomina concentración crítica de solubilización (csc), y depende principalmente de la concentración de lípido en las condiciones iniciales. Se puede observar simplemente de manera visual por la disminución de la turbidez de la solución. La csc disminuye al aumentar la temperatura, pero para mantener funcional a la proteína es preferible mantener baja la temperatura y aumentar la concentración de detergente (Prive, 2007).

La **solubilización de bicapas lipoproteicas** seguiría en general el mismo esquema descrito anteriormente (figura 29). Los detergentes compiten con los lípidos para ocupar las regiones hidrofóbicas de las proteínas de membrana, aunque esta competición es relativamente ineficiente, de manera que se requiere un exceso muy grande de detergente sobre el lípido para desplazar a éste de la superficie de la proteína, lo que puede dar lugar a la inactivación o agregación de la proteína. Es preferible por tanto una relación detergente/lípido moderada en lugar de elevada (Silvius, 1992). Además no es necesaria una preparación pura de proteína, sino que en muchos casos es preferible el aislamiento de complejos proteína-lípido que permiten el estudio de estructura y función de las proteínas de membrana en ambientes más próximos a los nativos (Prive, 2007).



**Figura 29.** Etapas en la solubilización de una bicapa lipídica con proteínas de membrana.

Tras la solubilización de la proteína se puede observar si existen agregados mediante SDS-PAGE, ya que los agregados más grandes no se disocian con el SDS del tampón de carga, y quedan atrapados en la interfase entre el gel concentrante y el

separador (Prive, 2007). No obstante cabe resaltar que las proteínas de membrana frecuentemente no se mueven en estas electroforesis según su masa molecular esperada, sino que poseen migraciones atípicas debido a un desplegamiento parcial o a una unión diferente al SDS de la que presentan las proteínas solubles (Garavito y Ferguson-Miller, 2001).

Finalmente, una vez solubilizadas las proteínas de membrana puede ser necesario llevar a cabo la **reconstitución de membranas lipoproteicas** de composición controlada. La reconstitución de proteoliposomas puede realizarse principalmente mediante dos métodos (Seddon et al., 2004). En primer lugar por dilución de la mezcla proteína/detergente en una suspensión de liposomas, de manera que la concentración de detergente caiga por debajo de la cmc, con lo que la micela se hace inestable, transfiriéndose la proteína a los liposomas. La segunda opción consiste en la introducción de detergente en preparaciones de liposomas preformados para romper las interacciones lípido-lípido y hacerlos más permeables a la proteína, con la posterior eliminación del exceso de detergente.

Las variaciones en las condiciones de reconstitución, especialmente la velocidad de eliminación del detergente, conllevan a variaciones en el tamaño de las vesículas y heterogeneidad y asimetría en la orientación de la proteína en la preparación final. La eliminación rápida del detergente da lugar generalmente a la formación de vesículas con distribución de proteína más homogénea, ya que la incorporación de la proteína ocurre a la vez que se produce la formación de las vesículas. Sin embargo, si la retirada del detergente es lenta, la incorporación de la proteína y la formación de las vesículas son eventos separados, dando lugar a una mezcla heterogénea de proteoliposomas y liposomas sin proteína, además de diferentes orientaciones de la proteína (Silvius, 1992; Rigaud et al., 1997).

La eliminación del detergente puede realizarse por diversos métodos: dilución, diálisis, filtración en gel, ultracentrifugación. Todos ellos eliminan sólo monómeros, por lo que sólo son útiles para detergentes con elevada cmc (del orden de mM). La adsorción selectiva a resinas hidrofóbicas sin embargo es útil también para detergentes con baja cmc (Silvius, 1992).

Las **partículas hidrofóbicas** Bio-Beads SM son partículas neutras, macroporosas y con una gran área superficial. La unión del detergente a ellas parece ocurrir por fuerzas hidrofóbicas, y al no implicar interacciones polares la adsorción no se ve afectada por cambios en el pH o la fuerza iónica. La máxima cantidad de detergente que puede ser adsorbida por gramo de partículas se denomina capacidad de adsorción, y en el caso del CHAPS es de 85 mg CHAPS/g partículas. Esta propiedad permite regular la velocidad de eliminación del detergente, de manera que la incorporación masiva de partículas conlleva una retirada rápida en función de su capacidad de adsorción, mientras que la adición progresiva de pequeñas cantidades de partículas ralentiza el proceso de reconstitución. Además, aunque la capacidad de

adsorción es independiente de la temperatura, la disminución de ésta produce una ralentización de la cinética, siendo tres veces más rápida a 25°C que a 4°C. La capacidad de las partículas para retirar rápidamente el detergente, y la posibilidad que ofrecen de regular la velocidad de eliminación, resultan importantes para generar vesículas homogéneas como se ha explicado anteriormente (Rigaud et al., 1997).

Aunque la capacidad de adsorción de lípidos a las partículas es mucho menor que para los detergentes (1-4 mg/g), se puede producir una pérdida parcial de lípidos de la preparación. Para evitar esto es aconsejable preincubar las partículas con lípido para saturarlas antes de añadir la proteína con detergente, y realizar varios cambios con cantidades pequeñas de partículas seguidos de un último paso a una proporción mayor (Rigaud et al., 1997).

Por último cabe mencionar que toda preparación reconstituida puede contener niveles residuales de detergente así como fracciones de moléculas de proteína no nativas, cuyos efectos en el comportamiento de la preparación hay que tener en cuenta (Silvius, 1992).





## **OBJETIVOS**



## 2. OBJETIVOS

La SP-B es la proteína más importante del surfactante pulmonar, según muestra el hecho de que su ausencia sea letal. Su naturaleza hidrofóbica ha dificultado la elucidación de ciertas de sus características principales, desconociéndose hasta el momento su estructura tridimensional y su forma concreta de interacción con las membranas y películas del surfactante, lo que todavía hoy es motivo de controversia, suponiéndose principalmente una interacción superficial, que a veces es descrita como más profunda.

Así mismo, la organización dimérica atribuida a la SP-B, así como muchas de sus propiedades estructurales, se han elucidado a partir de estudios realizados sobre la proteína purificada en disolventes orgánicos. Este tipo de tratamiento drástico de la SP-B podría perturbar importantes interacciones proteína/proteína, cuya existencia es sugerida a partir de numerosas evidencias de autoasociación o de interacción de SP-B con otras proteínas del surfactante (SP-A o SP-C). Además, la tendencia a la agregación y a la formación de complejos supradiméricos, observada por diversos autores, apuntan a una organización supramolecular compleja de la SP-B cuando se encuentra en estado nativo en los complejos del surfactante pulmonar. Considerando estos antecedentes, el **primer objetivo general** de la presente Tesis consiste en **estudiar la existencia de complejos proteicos nativos en el surfactante pulmonar, prestando especial atención a aquellos complejos en los que participa la SP-B**. Para abordar dicho estudio, se han realizado dos aproximaciones que se resumen en los siguientes objetivos concretos, que serán tratados en los capítulos 4 y 5 de esta Tesis:

- Elaboración de un modelo de la estructura tridimensional de la SP-B, basado en la estructura conocida de la saposina B.
- Detección y caracterización de complejos nativos en los que participen las proteínas del surfactante, especialmente la SP-B, mediante la utilización de detergentes no desnaturalizantes.

Por otro lado, la principal función del pulmón es sostener la respiración. Dado que el oxígeno ha de atravesar las películas y complejos de surfactante pulmonar para llegar desde el aire hasta los capilares pulmonares, se plantea como **segundo objetivo general** de esta Tesis el **estudio del papel del surfactante pulmonar en la difusión de oxígeno**. Para ello, se establecieron dos objetivos concretos que se tratan en el capítulo 6 de la presente Tesis:

- Estudio del efecto del surfactante pulmonar en la difusión del oxígeno.
- Estudio del efecto de la hipoxia en la composición y función del surfactante pulmonar.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Obtención de las muestras biológicas

##### 3.1.1. Obtención del surfactante pulmonar de cerdo y de sus fracciones

###### 3.1.1.1. *Purificación del surfactante pulmonar*

Los complejos nativos del surfactante pulmonar se obtuvieron a partir del lavado broncoalveolar de pulmones porcinos según un método optimizado en el laboratorio (Curstedt et al., 1987; Casals et al., 1989; Taeusch et al., 2005).

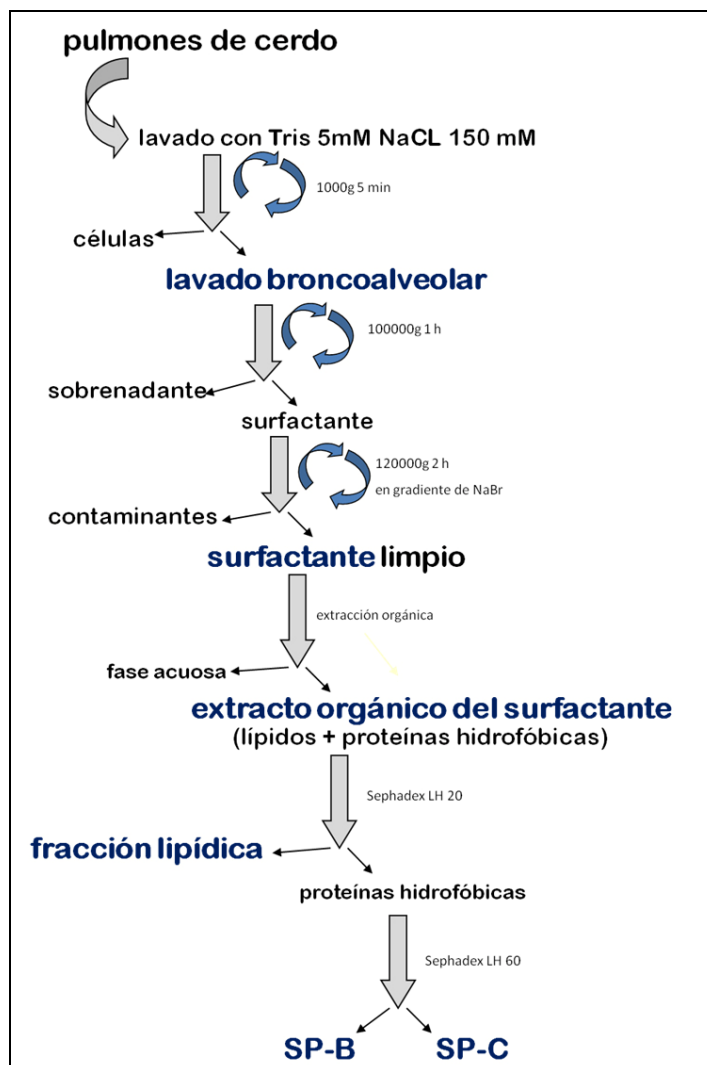
Los pulmones de cerdo fueron obtenidos del matadero municipal de Boadilla del Monte y del de Guadalix de la Sierra, en Madrid, y transportados en hielo hasta el laboratorio. Los lavados broncoalveolares de cada par de pulmones se obtuvieron introduciendo por la tráquea aproximadamente 1 litro de tampón Tris 5mM pH 7, NaCl 150 mM, masajeando los pulmones y vertiendo su contenido en un recipiente con una gasa para filtrar los posibles restos de tejido. El lavado se realizó 2 veces para cada aparato respiratorio. Estos lavados acumulados se centrifugaron durante 5 minutos a 1000xg a 4°C para eliminar células y restos de tejido, y el sobrenadante (**lavado broncoalveolar** libre de células o LBA) se conservó a -20°C.

Para obtener los complejos del surfactante pulmonar se realizó una **ultracentrifugación** del LBA a 100,000xg durante 1 hora a 4°C. Los precipitados obtenidos se separaron de los potenciales contaminantes sanguíneos mediante una centrifugación en gradiente de densidad. Para ello se resuspendieron en una solución de NaCl 0.9% y NaBr 16% que se dispuso en el fondo de un tubo de centrifuga, y sobre esta resuspensión se colocó un cierto volumen de una solución NaCl 0.9% NaBr 13%, y finalmente, encima de todo, una solución de NaCl 0.9%. El conjunto se centrifugó durante 2 horas en un rotor flotante a 120,000xg a 4°C, obteniéndose una banda de surfactante en la interfase entre las dos soluciones de menor densidad del tubo. Estas membranas se recogieron con una espátula, se homogeneizaron en un *potter* con tampón Tris 5mM pH 7, NaCl 150mM, y tras alicuotarse, se conservaron a -80°C.

###### 3.1.1.2. *Obtención del extracto orgánico del surfactante*

Para obtener la fracción orgánica del surfactante se realizó una extracción según el método de Bligh y Dyer (Bligh y Dyer, 1959) de la siguiente manera: la muestra fue agitada y calentada a 37-40°C junto con 1 volumen de cloroformo y 2 volúmenes de metanol (ambos reactivos de grado HPLC adquiridos de Scharlau, Barcelona). Tras 30 minutos de incubación se añadió 1 volumen más de cloroformo y 1 volumen de agua miliQ. El conjunto se agitó y se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos. La fase orgánica se recogió en un tubo y la acuosa fue centrifugada de nuevo tras añadir 2 volúmenes de cloroformo, repitiéndose este paso dos veces para intentar recuperar la mayor parte posible de material. El conjunto de fases orgánicas recogidas se reunió y se lavó con KCl 0.15M (utilizando un volumen aproximado correspondiente al 25% del

volumen total reunido) para eliminar las posibles trazas de agua. Este extracto, que contiene los **lípidos y proteínas hidrofóbicas** del surfactante en cloroformo/metanol (2:1), se conservó a -20°C.



**Figura 30.** Esquema resumen de la purificación del surfactante pulmonar y de las fracciones que han sido utilizadas en la presente Tesis (resaltadas en azul).

### ***3.1.1.3. Purificación de las proteínas hidrofóbicas del surfactante a partir del extracto orgánico***

El extracto orgánico se concentró en un rotavapor hasta un volumen final de aproximadamente 0.5 ml, que fue cargado en una columna de penetrabilidad **Sephadex LH-20** (Amersham Biosciences) para separar los lípidos de las proteínas hidrofóbicas. La fase móvil de esta cromatografía consiste en cloroformo/metanol (2:1) y el perfil cromatográfico fue seguido mediante la medida de absorbancia a 240 y 280 nm. Esto



permite identificar una primera fracción que contiene las proteínas, y a continuación varias fracciones de diferente composición lipídica.

La fracción de proteínas se concentró y fue cargada en una segunda columna de penetrabilidad **Sephadex LH-60** (Amersham Biosciences) eluida utilizando como fase móvil cloroformo/metanol (1:1) conteniendo 0.5% HCl 1N. El perfil de elución de la columna reveló una primera fracción de proteína que absorbe a las dos longitudes de onda monitorizadas (240 y 280 nm) y que corresponde a la SP-B y una segunda fracción de SP-C que sólo absorbe a 240 nm debido a la ausencia de residuos aromáticos en su secuencia.

Las proteínas purificadas de la manera descrita fueron conservadas a -20°C y se cargaron en geles de poliacrilamida para comprobar su pureza y estado de agregación mediante electroforesis en presencia de SDS, tinción con plata y *Western blot*.

### **3.1.2. Obtención de pulmón, lavados broncoalveolares, surfactante y agregados grandes y pequeños del surfactante de ratas sometidas a hipoxia**

La manipulación de los animales se llevó a cabo durante varias estancias cortas en el laboratorio del **Dr. José López-Barneo**, en el Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), en el Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC.

Todas las ratas utilizadas fueron hembras de 2 meses de edad. El grupo de ratas sometidas a hipoxia fueron mantenidas en una cámara de hipoxia durante 72 horas al 10% de oxígeno. El día de la operación las ratas fueron pesadas y anestesiadas con hidrato de cloral. Se realizó en primer lugar una perfusión de los animales introduciendo NaCl 0.9% con una aguja conectada a una bomba peristáltica por el ventrículo izquierdo, realizándose un corte en la aurícula derecha para permitir la salida de la sangre y posteriormente del tampón. Tras clampar el pulmón derecho, el izquierdo se lavó con NaCl 0.9% (3 veces con 1 ml de tampón por cada 100g de peso de la rata) y el contenido del lavado se centrifugó para eliminar células tal y como se describe en el apartado 3.1.1.1. Los lavados broncoalveolares fueron alicuotados y conservados a -80°C. El pulmón derecho fue retirado y cortado en 4 fracciones (figura 31) que fueron inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido para posteriormente ser conservadas a -80°C. Los trozos número 3 se utilizaron para los experimentos de proteómica mientras que los trozos numerados como 4 se usaron para la obtención de RNA.

Para la obtención del surfactante pulmonar de rata, en otros animales, ambos pulmones fueron lavados y el surfactante se purificó según el protocolo descrito en el apartado anterior.



**Figura 31.** Esquema de la utilización de los pulmones de rat a para la obtención del lavado alveolar y los trozos de tejido.

Para la determinación de la relación de fosfolípido entre las diferentes fracciones del surfactante, éstas se separaron mediante una centrifugación a 48,000xg durante 1 hora a 4°C, obteniéndose los agregados grandes (LA) en el precipitado, y los agregados pequeños (SA) en el sobrenadante. Para la cuantificación de fosfolípido en los SA se realizó una extracción orgánica de los mismos, de la manera descrita anteriormente en el apartado 3.1.1.2.

## 3.2. Técnicas bioquímicas

### 3.2.1. Determinación de lípidos y proteínas

#### 3.2.1.1. Determinación de la cantidad de fosfolípido

La cuantificación de fosfolípido en las muestras se llevó a cabo mediante el método de Rouser (Rouser et al., 1966), que valora el fósforo de los fosfolípidos previa conversión en fosfato inorgánico.

Para ello se preparó una recta patrón por duplicado con  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . El contenido de los tubos de la recta, así como las muestras (bien en solución acuosa o en disolvente orgánico) se secaron en un baño de arena en el que posteriormente se realizó la mineralización del fósforo, incubando las muestras con 450  $\mu\text{l}$  de ácido perclórico a 260°C durante 30 minutos con los tubos tapados con ampollas de vidrio para evitar la evaporación.

Una vez mineralizado, el fósforo se cuantificó mediante una reacción colorimétrica añadiendo 3.5 ml de agua miliQ, 0.5 ml de molibdato de amonio 2.5% (p/v) y 0.5 ml de ácido ascórbico 10% (p/v), e incubando los tubos durante 7 minutos a 100°C. Tras parar la reacción con hielo la absorbancia de cada tubo se leyó a 820 nm.

#### 3.2.1.2. Cuantificación de colesterol

La cuantificación de colesterol en el surfactante pulmonar de rat a se llevó a cabo mediante la utilización de un kit comercial (Spinreact, Girona), basado en la reacción de la enzima colesterol oxidasa. Se preparó una recta patrón por duplicado a partir del patrón de colesterol suministrado por el kit, y tras añadir los reactivos enzimáticos se midió la absorbancia a 505 nm.

### 3.2.1.3. Cuantificación de proteínas mediante análisis de aminoácidos

La cuantificación de las proteínas hidrofóbicas del surfactante purificadas se realizó mediante análisis de aminoácidos debido a su elevada hidrofobicidad y su bajo contenido en residuos aromáticos, lo cual dificulta su cuantificación mediante los métodos colorimétricos más comúnmente utilizados.

Para realizar este análisis a las muestras previamente secadas se les añadió 100 µl de una disolución de HCl 6N, fenol 0.1% que contiene una cantidad conocida de *nor-leucina* como estándar interno. Tras cerrar los tubos a vacío se incubaron a 110°C durante 24 horas para el desarrollo de la hidrólisis ácida.

Posteriormente se abrieron los tubos y se secaron mediante flujo de nitrógeno primero y luego en una centrifuga a vacío. Una vez eliminado el ácido clorhídrico se realizaron 3 lavados con 100 µl de agua, secándose tras cada paso, y finalmente se les añadió 50 µl de tampón de análisis. Las muestras fueron procesadas en un analizador automático Beckman System 6300 High Performance.

### 3.2.1.4. Cuantificación de proteína total mediante el método de Lowry

La cuantificación de proteínas totales en lavados broncoalveolares, surfactante y fracciones resultantes de la solubilización con detergentes, se realizó mediante una modificación del método de Lowry (Lowry et al., 1951).

Para ello se preparó una recta patrón con cantidades de 0 a 50 µg de albúmina por duplicado. Tanto a la albúmina como a las muestras problema se les añadió 60 µl de SDS 10%, y 1 ml de la mezcla tartrato sódico-potásico 2%, CuSO<sub>4</sub> 0.01% y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.02%. Tras la incubación durante 15 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 100 µl de reactivo de Folin ½ y los tubos se incubaron durante 30 minutos. Finalmente se midió la absorbancia a 700 nm.

### 3.2.2. Separación de complejos proteicos solubilizados con detergentes

La mayoría de los experimentos presentados en esta Tesis están realizados con el detergente **CHAPS** (Sigma), un detergente no desnaturalizante comúnmente utilizado en la solubilización y purificación de proteínas de membrana. El surfactante fue solubilizado con CHAPS, durante 1 hora en agitación, utilizando una proporción detergente/lípido de 5:1 (p/p). La elección de la concentración de detergente utilizada se basó en la comparación del decaimiento de la absorbancia aparente a 340 nm con distintas concentraciones de detergente.

En el caso de los demás detergentes utilizados la proporción detergente/lípido empleada para la solubilización fue 1:1 (p/p) para la **digitonina** (Sigma), y 2:1 (p/p) para el **dodecilmaltósido** (Sigma).

Para la aplicación de las muestras en las cromatografías de penetrabilidad e intercambio iónico, tras la incubación con el detergente se realizó una centrifugación de

las muestras durante 30 minutos a 12000 rpm a 4°C, y el sobrenadante, es decir, la fracción solubilizada, fue cargado en las columnas.

En todos los pasos durante la manipulación de los complejos proteína/detergente se mantuvieron concentraciones de detergente por encima de su concentración micelar crítica (cmc) para evitar su dilución y por tanto la agregación de la proteína. Las características de los detergentes utilizados en esta Tesis se detallan en el apartado 1.8 de la introducción (figura 28).

### **3.2.2.1. Centrifugación en gradiente de densidad**

Considerando la flotabilidad de las membranas de surfactante en gradientes de densidad, se preparó un **gradiente de sacarosa** con soluciones del 15% al 54%, en tampón Tris 5mM pH7, NaCl 150 mM, conteniendo además todas ellas una concentración de detergente correspondiente a la cmc. Para la formación del gradiente se añadieron las soluciones de mayor a menor concentración de sacarosa, congelándolas en nitrógeno líquido antes de añadir la siguiente. Una vez congelado todo el gradiente se dejó descongelar a 4°C. Se cargó el surfactante solubilizado con el detergente correspondiente y se centrifugó durante toda la noche en una ultracentrífuga Beckman a 28000 rpm en el rotor flotante SW40, a 4°C.

Una vez terminada la centrifugación se introdujo con cuidado en el fondo del tubo la punta de una pipeta Pasteur conectada a un tubo capilar, y utilizando una bomba peristáltica y un colector se recogieron fracciones de 250 µl, cuya absorbancia se midió a 240 y 280 nm. En todos los casos se observó la presencia de un precipitado en el tubo que consiste en la fracción no solubilizada. Las últimas fracciones recogidas (es decir, las que flotaron en la parte superior del tubo) contuvieron la mayor parte del lípido del surfactante, según mostró la cuantificación de fosfolípido realizada.

También se realizaron centrifugaciones en gradiente de densidad de suspensiones preparadas a partir del extracto orgánico y la fracción lipídica del surfactante. Para ello las muestras en disolvente orgánico se secaron bajo un flujo de nitrógeno y en centrífuga a vacío, y se rehidrataron con tampón Tris 5mM pH 7, NaCl 150 mM agitando a 42°C cada 10 minutos durante 2 horas, obteniéndose así suspensiones multilamelares. La concentración de lípido final fue la misma que en los experimentos de solubilización de surfactante descritos anteriormente. En el caso de la fracción lipídica conteniendo SP-B, se añadió la proteína al lípido antes del paso de secado del disolvente, utilizándose distintas relaciones lípido/proteína (100:1, 50:1 y 10:1) en las que la cantidad de proteína se mantuvo constante (0.3 mg) y lo que varió fue la cantidad de lípido (30, 15 y 3 mg respectivamente). Una vez rehidratadas las muestras se solubilizaron con detergente, se cargaron en los gradientes y se procedió igual que con el tratamiento del surfactante entero.

### 3.2.2.2. *Cromatografía de penetrabilidad Sephacryl S-400*

Con la cromatografía de exclusión molecular Sephacryl S-400 HR (Amersham) se pretendió separar las fracciones solubilizadas con detergente en función del diferente tamaño de sus componentes, presumiblemente debido a la presencia de diferentes complejos proteicos.

La columna de 1.5 x 30 cm fue equilibrada con tampón Tris 5 mM pH 7, NaCl 150 mM, CHAPS 6 mM. Posteriormente fue saturada de lípido eluyendo una mezcla de DPPC/POPC/POPG/colesterol (50:25:15:10) a 40 mg/ml solubilizado con CHAPS en una relación detergente/lípido de 5:1 (p/p).

El surfactante solubilizado con CHAPS, a una concentración final de 40 mg/ml de lípido, se cargó en la columna y se recogieron fracciones de aproximadamente 0.5 ml, siguiéndose el perfil de elución mediante la medida de la absorbancia a 240 y 280 nm. La localización de lípido en el perfil se realizó, como en el caso de la centrifugación en gradiente de densidad, mediante valoración de fósforo de las fracciones de la columna.

### 3.2.2.3. *Cromatografía de intercambio iónico Hitrap SP*

La columna pre-empaquetada Hitrap SP HP (Amersham) de 5ml es una columna de **intercambio catiónico** fuerte, en la que las proteínas con carga neta positiva, como SP-B y SP-C, quedan retenidas por interacción electrostática con sus grupos funcionales sulfopropilos, de manera que para eluir las es necesario un aumento de la fuerza iónica del tampón.

La cromatografía se desarrolló según las especificaciones suministradas por el fabricante, para lo cual la columna se conectó a una bomba peristáltica y a un colector de fracciones. Todos los tampones utilizados fueron filtrados previamente. El equilibrado de la columna se llevó a cabo con 25 ml de tampón de inicio (fosfato 50 mM pH 7, NaCl 25 mM), seguido de 25 ml de tampón de elución (fosfato 50 mM, pH 7, NaCl 1 M) y de nuevo 25 ml de tampón de inicio.

La muestra se llevó a un volumen de 10 ml en tampón fosfato para una concentración final de NaCl 25 mM. Tras pasar la muestra se eluyó la columna con tampón fosfato con concentraciones crecientes de NaCl: 150 mM, 500 mM y finalmente 1 M. El perfil de elución se siguió midiendo la absorbancia de las fracciones recogidas (aproximadamente 1 ml) a 280 nm.

## 3.2.3. **Caracterización electroforética de las proteínas**

### 3.2.3.1. *Electroforesis en presencia de SDS*

Las proteínas purificadas a partir del extracto orgánico de surfactante, las muestras de lavados broncoalveolares y surfactante de rata, y los complejos proteicos obtenidos a partir de la solubilización con detergentes, fueron estudiadas mediante análisis electroforético en geles de poliacrilamida.

En el caso de las proteínas en disolvente orgánico éste fue evaporado completamente mediante un flujo de nitrógeno para resuspender después las muestras con el tampón de carga, **en presencia o ausencia de 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol** (según se pretendiera un análisis en condiciones reductoras o no reductoras respectivamente). Para las proteínas en medio acuoso el tampón de carga se añadió directamente a las muestras. Tras hervir las muestras durante 5 minutos, el volumen final cargado por pocillo fue siempre de entre 15 y 20  $\mu$ l.

Los geles utilizados se prepararon con **diferentes porcentajes de acrilamida (7.5%, 12% y 16%)** en función del tamaño esperado de los complejos y de si las condiciones de la electroforesis fueron reductoras o no. En todos los geles se cargaron patrones preteñidos de masa molecular conocida, que fueron de dos tipos en función del porcentaje de acrilamida: de alto o bajo peso molecular (Bio-Rad). Para los geles que posteriormente se transfirieron a membranas de inmunodetección, se utilizaron patrones coloreados.

Las electroforesis fueron desarrolladas en el sistema Miniprotean 3 (Bio-Rad) con un tampón de electroforesis Tris-glicina pH 8.3 y en presencia de SDS, manteniendo un amperaje constante de 25 mA por gel.

Tras la electroforesis los geles fueron teñidos con plata o transferidos para la inmunodetección de las proteínas.

#### **3.2.3.2. Tinción con plata**

Los geles fueron teñidos con nitrato de plata según el método descrito por Heukeshoven y Dernick (Heukeshoven y Dernick, 1988).

Para ello fueron sumergidos primero en una solución de fijación de etanol/acético durante 30 minutos, y posteriormente en la solución de incubación que contenía etanol, acetato sódico, tiosulfato sódico y glutaraldehído, durante al menos 30 minutos. En los casos en que los geles fueron utilizados para identificación de proteínas por espectrometría de masas, el glutaraldehído fue suprimido de esta solución.

La solución de tinción contenía nitrato de plata y formaldehído, y tras sumergir los geles en ella durante 40 minutos la reacción fue desarrollada con una solución de carbonato sódico y formaldehído. Una vez conseguida la tinción deseada la reacción se paró con una solución de EDTA 40 mM.

#### **3.2.3.3. Western blot**

Para la inmunodetección de las bandas de proteína en los geles de electroforesis, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Amersham) salvo en el caso del análisis de la SP-C, en el que la transferencia se realizó a membranas de polivinilo o PVDF (Bio-Rad). Para las inmunodetecciones de SP-B y SP-C las transferencias se realizaron en húmedo a 300 mA durante 1 hora, mientras que para

todos los demás casos fueron desarrolladas en semi-seco a 20V durante 20 minutos. El tampón de transferencia fue un tampón Tris-glicina con 20% (v/v) de metanol.

Los bloqueos, lavados e incubaciones de las membranas con los anticuerpos se realizaron con el sistema a vacío SNAP (Millipore). El tampón de lavado utilizado fue PBS con Tween al 0.1% (v/v). El bloqueo se realizó con este tampón conteniendo leche en polvo al 0.05% (p/v). Los anticuerpos y diluciones utilizadas fueron las siguientes: anti-SP-B 1:5000 y anti-SP-C 1:7000 (ambos de Seven Hills Bioreagents, Cincinnati), anti-SP-A 1:2000 (donado generosamente por la Dra. Joe Wright, de Duke University, USA) y anti-hemoglobina 1:4000 (Biogenesis). El anticuerpo secundario utilizado para todos ellos fue un anti-IgG de conejo conjugado a HRP de Santa Cruz Biotechnology, en una dilución 1:10000. El revelado se realizó con una solución comercial de ECL (Millipore).

En los casos de cuantificación de proteínas a partir de *Western blot*, ésta se realizó mediante densitometrado de las bandas con el programa informático Quantity One (Bio-Rad).

#### 3.2.3.4. *Electroforesis nativas*

El estudio de los complejos proteicos solubilizados con detergentes se abordó también mediante electroforesis en condiciones nativas del tipo “**Blue Native**” (BN) (Schagger y von Jagow, 1991) que fueron principalmente desarrolladas en el laboratorio del **Dr. Antonio Enríquez** del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC-CSIC).

Esta electroforesis carente de SDS se basa en la utilización de la sonda aniónica Coomassie Blue G-250 (Sigma) para inducir un cambio de carga en las proteínas, previamente solubilizadas con un detergente suave, lo que permita el desarrollo de una electroforesis en la que la migración electroforética de los complejos proteicos depende esencialmente de su masa y no tanto de la carga. Además se suele incorporar el ácido aminocaproico, que mejora la solubilización de las proteínas de membrana.

Para estas electroforesis se polimerizaron geles con un formador de gradiente, en rangos de 3-13% y 5-20% de acrilamida. El tampón de carga contenía Blue G 5% y ácido aminocaproico 1 M, y se utilizaron dos tampones de electroforesis: el del cátodo, conteniendo BisTris 15 mM, Tricina 50 mM pH 7 y Blue G 0.02% y el del ánodo, con BisTris 50mM pH 7. La electroforesis se realizó a 4°C manteniendo primero 30 minutos a 90V y luego 1 hora a 300V.

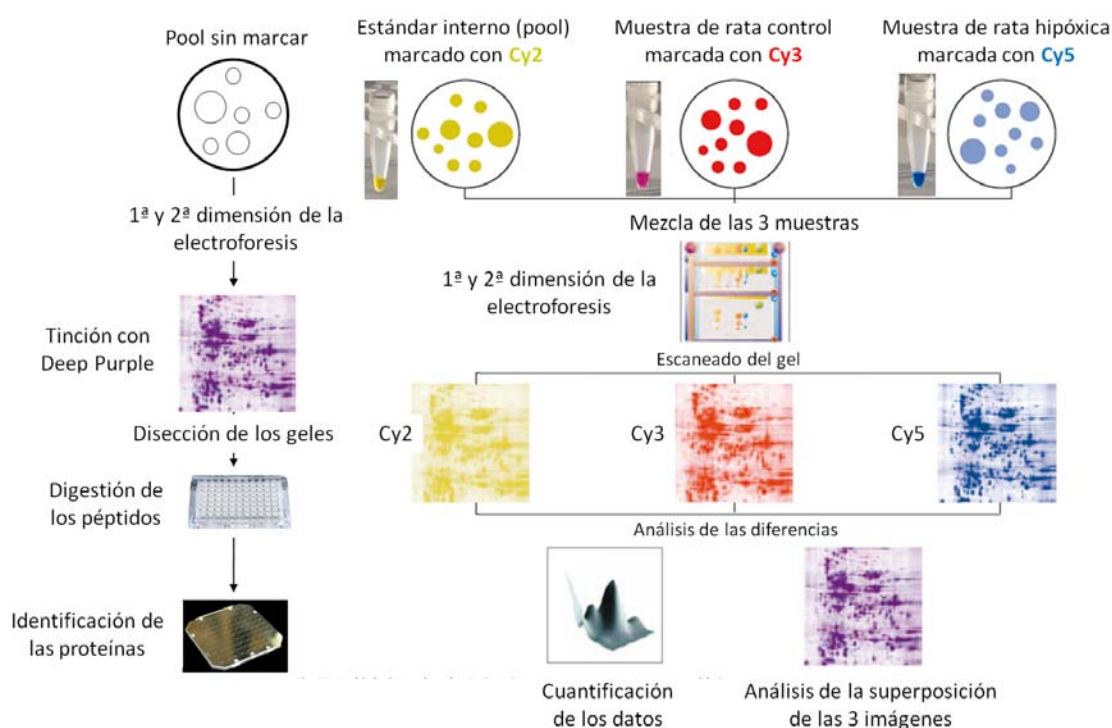
Estos geles fueron teñidos con plata o transferidos a membranas para inmunodetección (en este caso las transferencias se realizaron también a 4°C).

#### 3.2.3.5. *Electroforesis bidimensional de las muestras de pulmón de rata*

Estos experimentos fueron realizados durante una estancia de 4 meses en el laboratorio del **Dr. David Phelps** en la Universidad de Pensilvania (Hershey, USA).

La electroforesis bidimensional diferencial cuantitativa con tinción fluorescente (**2D-DIGE**, del inglés, “Difference Gel Electrophoresis”) es un método que permite el análisis preciso de diferencias en la abundancia de proteínas entre diferentes muestras (en este caso las muestras recogidas de las ratas control y de las sometidas a hipoxia). El hecho de poder analizar conjuntamente varias muestras marcadas con diferentes fluoróforos en un mismo gel permite concluir que las diferencias entre ellas no son debidas a la variabilidad interexperimental, ya que las muestras son sometidas a exactamente las mismas condiciones durante la electroforesis.

Un resumen de los pasos que constituyen el experimento se muestra en la figura 32.



**Figura 32.** Resumen de la metodología seguida para electroforesis 2D-DIGE (modificado a partir del manual del fabricante, GE Healthcare). Se realizaron dos experimentos, uno para lavados broncoalveolares y otro para homogeneizado de pulmón. Cada experimento supuso preparar 1 gel sin sondas fluorescentes para la identificación de las proteínas por espectrometría de masas, y 6 geles con sondas fluorescentes, conteniendo cada gel una muestra control y una hipóxica, es decir, que para cada experimento se analizaron muestras procedentes de 6 animales de cada grupo.

### Preparación de las muestras

El **tejido** congelado fue pulverizado y sonificado durante 10 segundos en 1 ml de tampón de lisis (Tris 30 mM pH 8.5, tiourea 2M, urea 7M, CHAPS 4%, pH 8.5) por cada 100 mg de pulmón. Tras una centrifugación a 150xg a 4°C durante 5 minutos la



concentración de proteína en los sobrenadantes se determinó utilizando el Kit Bio-Rad Micro Assay.

Los **lavados broncoalveolares** fueron concentrados en tubos Agilent (Agilent Technologies), mediante centrifugación a 3000xg durante toda la noche a 4°C. Tras liofilizarlos fueron disueltos en el tampón de lisis. La concentración de proteína en estas muestras se determinó con el Kit BCA Protein Assay (Pierce).

### **Marcaje de las proteínas con los fluoróforos CyDye para DIGE**

Las sondas utilizadas fueron **Cy2** (longitud de onda de excitación 488 nm / emisión 520 nm), **Cy3** (532 nm / 580 nm) y **Cy5** (633 nm / 670 nm). Estas sondas contienen una carga positiva de forma que tras su unión covalente a algunos residuos de lisina de las proteínas se reemplaza la carga de la lisina por la suya propia, asegurando que el punto isoeléctrico de la proteína no sea significativamente distinto al de la misma proteína sin marcar.

Se llevaron a cabo dos experimentos, uno con **lavados broncoalveolares** (6 procedentes de ratas controles y 6 de hipóxicas) y otro con los **homogeneizados de pulmón** (6 de controles y 6 de hipóxicas). Para cada experimento se marcaron 50 µg de cada muestra con Cy3 o Cy5, siguiendo las indicaciones del fabricante (GE Healthcare). Para ello se añadió la sonda a la muestra y tras 30 minutos de incubación en hielo se detuvo la reacción con lisina. Además se creó una nueva muestra de 750 µg de proteína conteniendo cantidades iguales de proteína de cada condición. De este control se dejaron 400 µg sin marcar para cargar en el gel destinado a la recogida de puntos para identificación por masas. Los 350 µg restantes se marcaron con Cy2, para utilizarse como estándar interno en los 6 geles del experimento.

### **Desarrollo de la electroforesis bidimensional DIGE**

Para cada gel se mezclaron 50 µg de muestra marcada con Cy3 (de un animal control o hipóxico), 50 µg de muestra marcada con Cy5 (del otro grupo de animales) y 50 µg del pool marcado con Cy2. Se añadió el tampón de muestra que contenía tiourea 2M, urea 7M, tampón IPG (mezcla de anfolitos) pH 3-10 NL 0.5%, CHAPS 4% y reactivo DeStreak (GE Healthcare) 1.2%. Este tampón se añadió también al pool sin marcar del gel para masas.

Las primeras dimensiones de la electroforesis bidimensional, consistentes en un electroenfoque en gradiente inmovilizado de pH (IPG IEF), se desarrollaron en un aparato IPGphor II (GE Healthcare) en tiras de 24 cm de gradiente no lineal de pH 3-10 (pH 3-10NL Immobiline DryStrips de GE Healthcare), recomendado para obtener un barrido general de la distribución de proteína total en la muestra, logrando una mayor resolución en el rango de pH 5 a 7. La máxima longitud de las tiras permite la mejor resolución posible. En el caso de las muestras fluorescentes éstas fueron cargadas

mediante la técnica de “carga en copa” (*cup-loading*) en las tiras previamente hidratadas durante la noche con el tampón de rehidratación DeStreak Rehydration Solution (GE Healthcare), mientras que para el gel sin sondas fluorescentes las muestras fueron llevadas a 450 µl con el tampón de rehidratación y posteriormente cargadas en las tiras. Las condiciones de las electroforesis fueron las siguientes: 3 horas a 300V, 7 horas hasta alcanzar 1000V, 4 horas hasta 8000V y 4 horas a 8000V. Para el gel destinado al análisis por espectrometría de masas las condiciones fueron 15 horas a 0V (rehidratación), 6 horas a 30V, 3 horas a 300V, 3 horas hasta alcanzar 600V, 3 horas hasta alcanzar 1000V, 3 horas hasta alcanzar 8000V y 4 horas a 8000V.

Para las segundas dimensiones (PAGE/SDS) se polimerizaron geles grandes en gradiente de poliacrilamida en el rango 8-18%. Los cristales fueron previamente lavados siguiendo el siguiente protocolo de limpieza: 3 lavados con agua destilada, 1 lavado con HCl 0.1%, 3 lavados con agua, inmersión en detergente durante toda la noche, 4 lavados con agua y secado al aire. Las tiras fueron equilibradas en las soluciones de equilibrio I (Tris 50 mM pH 8.8, urea 6 M, glicerol 30%, SDS 2%, DTT 0.5%) y II (con yodoacetamida 4.5% en lugar de DTT) durante 10 minutos cada una. Posteriormente se colocaron en los geles y se sellaron con agarosa caliente que se dejó polimerizar durante 15 minutos. Las electroforesis fueron desarrolladas con tampón Tris/glicina/SDS pH 8.6, en el sistema Ettan DALTtwelve (GE Healthcare), primero a 5 W/gel durante 30 minutos, y luego 5 horas a 15 W/gel. En el caso del gel para masas uno de los cristales se trató con solución de silano (etanol 80%, ácido acético glacial 0.02%, Bind-Silane 0.001%) (GE Healthcare) para permitir la retirada del otro cristal tras la electroforesis y la tinción fluorescente del gel con Deep Purple Total Protein Stain (GE Healthcare). Para ello se sumergieron los geles en una solución de fijación etanol 30%, ácido acético 7.5%. Tras lavar con agua se tiñeron los geles durante 2 horas en la solución de tinción que contiene borato sódico 100 mM. Posteriormente los geles se lavaron durante 30 minutos con etanol 15% y tras su acidificación con ácido cítrico y etanol se lavaron con agua y se dejaron secar en oscuridad.

### **Análisis de las imágenes de los geles**

Los geles fueron escaneados usando un analizador de imágenes fluorescentes Typhoon 9410 (GE Healthcare), y las imágenes obtenidas fueron analizadas con el programa Progenesis SameSpots v2.0 (Nonlinear USA), incluyendo el alineamiento de las imágenes, y la selección de los puntos. La cuantificación de los volúmenes normalizados para todos los puntos se obtuvo comparando la relación de cada valor de Cy3 o Cy5 con los valores obtenidos de la **normalización del canal de Cy2 (pool)** de cada gel. Para el análisis de las imágenes se procedió primero al alineamiento de los geles: para cada experimento, se elige una imagen de Cy2 llamada **gel de referencia**, con el que se alinearán todas las demás imágenes del experimento. Cada imagen de Cy3 y Cy5 es alineada respecto a su control interno Cy2, y cada control interno además respecto al gel de referencia elegido. Una vez alineadas se procedió a seleccionar los puntos de manera manual para su análisis. Para comparar la expresión de proteínas entre

control e hipoxia, se calculó para cada animal la suma del volumen normalizado de todos los puntos de la misma proteína. El análisis estadístico fue realizado con *t-test* y análisis ANOVA de un solo factor (*one-way ANOVA*).

### Identificación de las proteínas por espectrometría de masas

Para ello se utilizó el gel sin sondas fluorescentes teñido con Deep Purple, para cada uno de los 2 experimentos. Tras escanear el gel, los puntos de proteína fueron extraídos de éste mediante la utilización del robot Ettan Spot Picker (GE Healthcare). Los fragmentos de los geles se lavaron dos veces durante 30 minutos a 37°C con bicarbonato amónico 200 mM acetonitrilo 40%, y luego fueron deshidratados con acetonitrilo 75% durante 20 minutos seguido de secado al aire durante 30 minutos a 30°C. Las proteínas fueron digeridas con tripsina (grado proteómico, Sigma) durante toda la noche a 37°C, tras lo cual se les añadió acetonitrilo 50% ácido trifluoroacético 0.1% y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. La solución se transfirió a una nueva placa y se secó a vacío. Los péptidos extraídos fueron resuspendidos en ácido trifluoroacético 0.5% y concentrados usando puntas C18 ZipTips (Millipore). Los péptidos fueron transferidos por triplicado a una placa de 384 pocillos para MALDI (también se transfirió a la placa un control consistente en un punto de gel sin proteína), y tras secarse se les añadió la solución con la matriz, consistente en ácido cinámico 2 mg/ml, acetonitrilo 60%, fosfato amónico 10mM.

Los péptidos fueron analizados mediante un espectrómetro de masas MALDI-TOF usando el analizador 4800 MALDI TOF/TOF Proteomics Analyzer (Applied Biosystems). Las identificaciones de proteínas consideradas como positivas fueron aquellas que tuvieron más de 95% de puntuación de intervalo de confianza MASCOT.

### 3.3. Análisis de la expresión génica

#### 3.3.1. Obtención de RNA de pulmones de rata

Estos experimentos fueron desarrollados durante una estancia realizada en el laboratorio de la **Dra. Joanna Floros** en la Universidad de Pensilvania, en Hershey.

El **tejido** congelado se pulverizó y se procedió al aislamiento de **RNA** mediante una extracción en fenol-cloroformo en presencia de tiocianato de guanidinio, con el reactivo comercial RNA-Bee (Tel-Test). Se añadieron 1.2 ml del reactivo para homogeneizar la muestra, tras lo cual se procedió a la extracción de RNA añadiendo 0.24 ml de cloroformo, dejando en hielo 30 minutos y centrifugando a 13000 rpm a 4°C durante 15 minutos. Para precipitar el RNA se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio y se añadió un volumen equivalente de isopropanol. Tras dejar 2 horas en hielo las muestras se centrifugaron a 10,000g durante 1 hora a 4°C. El precipitado se lavó con 500 µl de etanol al 75% y se centrifugó a 4°C durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y tras secarse el pellet se resuspendió con 25 µl de agua libre de RNasas.

La concentración del RNA fue determinada mediante medida de la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro Nanodrop, teniéndose en cuenta además la relación 260/280 para confirmar su pureza. La calidad del RNA fue caracterizada en un analizador Agilent 2100 (en un servicio facilitado por el centro de investigación).

### **3.3.2. PCR cuantitativa o a tiempo real**

La PCR a tiempo real permite monitorizar el progreso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mientras ocurre, recogiendo los datos durante el proceso y no sólo al final de la reacción, lo que permite cuantificar la expresión génica en la muestra. En esta técnica, a diferencia de la PCR a tiempo final, las reacciones se caracterizan por el ciclo durante el cual se detecta por primera vez el producto de la amplificación (Ct o “threshold cycle”) y no por la cantidad de target acumulado tras un número fijo de ciclos.

Para la eliminación del posible DNA genómico presente en la muestra se realizó un tratamiento con DNasa I (Ambion). Para ello se añadieron al RNA el tampón 10x suministrado con la DNasa y la enzima. Se incubó durante 30 minutos a 37°C y se paró la reacción con EDTA 5 mM. Para inactivar la enzima se incubó durante 10 minutos a 75°C.

Posteriormente se desarrolló la retrotranscripción del RNA de las muestras con la enzima retrotranscriptasa M-MLV (del inglés “Moloney Murine Leukemia Virus”) (Invitrogen) como se describe a continuación. Al RNA se le añadió oligo dTs y dNTPs, se incubó a 65°C durante 5 minutos y se colocó en hielo. Después se añadió el tampón de la enzima, DTT 0.1 M y un inhibidor de RNasas, y tras 2 minutos de incubación a 37°C se añadió la enzima. La mezcla de reacción se incubó nuevamente a 37°C durante 50 minutos tras los que se inactivó la reacción incubando 15 minutos a 70°C.

Los *primers* y sondas utilizados para la PCR fueron adquiridos de Applied Biosystems (Taqman® Gene Assays) y fueron los siguientes: **Sftpa1** (Rn00824545\_m1), **Sftpb** (Rn00593742\_m1), **Sftpc** (Rn00569225\_m1), **Sftpd** (Rn00563557\_m1), **Abca3** (Rn01461661\_g1), **Hif1a** (Rn00577560\_m1), **Retnla** (Rn00584229\_m1), **Gloa** (Rn01463755\_g1) y **Hbb** (Rn00583657\_g1). Además se utilizó el RNA ribosómico 18s (4333760F) como control endógeno. La sonda utilizada está flanqueada por el *reporter* FAM y el *quencher* MGB. Las PCR se desarrollaron en las siguientes condiciones: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, 40 ciclos consistentes en 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. La PCR fue desarrollada con el amplificador ABI Prism 7900HT y los datos fueron analizados con el programa informático Sequence Detection Software v2.2.

Dado que las especificaciones del kit sugieren la utilización de entre 1-100 ng de cDNA por cada 20 µl de reacción, se procedió a probar diferentes diluciones de cDNA molde para cada gen. Se determinó la eficiencia de amplificación de cada uno de ellos, mediante el cálculo de la pendiente de la recta en la representación logarítmica de la

concentración de cDNA frente a Ct (se considera una eficiencia del 100% aquella en la que la pendiente es igual a -3,32 en diluciones seriadas 1/10, considerándose aceptables eficiencias entre 90 y 110%), según lo cual se utilizaron finalmente 4 y 20 ng de cDNA para los ensayos. Cada muestra se cargó por triplicado y además se cargaron para cada gen dos controles (también por triplicado) uno sin cDNA molde y otro sin enzima.

El análisis de la cuantificación relativa de la expresión de los genes se desarrolló siguiendo el método de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak y Schmittgen, 2001). Según este método, como  $\Delta C_t = C_t^{\text{gen A}} - C_t^{\text{gen de referencia}}$ , para un animal control  $\Delta\Delta C_t$  es igual a 0, de donde  $2^0$  es igual a 1, mientras que para el animal tratado el valor de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  indica los cambios en la expresión del gen en relación al animal control.

### 3.4. Técnicas de caracterización estructural de proteínas

#### 3.4.1. Reconstitución de las partículas purificadas en detergente en micelas de LPC para su caracterización estructural

Para la caracterización estructural y funcional de los complejos de proteína obtenidos tras la separación con la columna Hitrap SP, se procedió a la eliminación del detergente mediante dos métodos diferentes, diálisis y adsorción a partículas de poliestireno.

Para la caracterización estructural de las partículas proteicas mediante emisión de fluorescencia intrínseca y dicroísmo circular, **se dializó el CHAPS** para intercambiarlo por micelas de lisofosfatidilcolina (LPC) mediante la utilización de las casetes dializadoras Slyde-A-Lyzer (Thermo Scientific) de 0.5 ml y membrana con un límite de fraccionamiento de 3.5 kDa. Para ello se secó una película de LPC que se resuspendió directamente con la muestra con detergente a una relación proteína/lisofosfolípido de 1:7 (p/p), incubándola en agitación durante 1 hora. A continuación, se inyectó la muestra en la casete y se procedió a la diálisis en tampón Tris 5 mM pH7, NaCl 150 mM, LPC 0.2 mM, realizando 2 cambios cada 3 horas y un último cambio después de toda la noche a 4°C. Además se prepararon los siguientes controles:

- Control SP-B+LPC: después de secar una mezcla en disolvente de la SP-B purificada en disolvente orgánico y LPC, se resuspendieron juntas en tampón Tris 5 mM pH7, NaCl 150 mM.
- Control SP-B+CHAPS+LPC: se secó SP-B purificada en disolvente orgánico y se reconstituyó con tampón Tris 5 mM pH7, NaCl 150 mM, CHAPS 6 mM. Se añadió LPC y se dializó en el tampón con LPC como en las muestras de la cromatografía en la columna Hitrap.
- Control LPC: se secó LPC y se resuspendió en tampón Tris/NaCl.
- Control LPC+CHAPS: se secó LPC, se resuspendió en tampón con CHAPS y se dializó en tampón con LPC.

### **3.4.2. Emisión de fluorescencia intrínseca**

Para estudiar las posibles diferencias en la estructura de la proteína obtenida mediante la solubilización con detergentes en comparación con la purificada en disolvente orgánico, se realizó un análisis del espectro de emisión de fluorescencia de sus residuos aromáticos.

La fluorescencia de los complejos proteicos obtenidos a través de la columna de intercambio iónico se analizó tras la eliminación del CHAPS mediante diálisis frente a LPC, teniendo también en cuenta la posible fluorescencia de los controles que se describen en el apartado anterior. Se registró el espectro de emisión de 300 a 400 nm mediante excitación a 275 nm (emisión de fluorescencia total de la proteína) y a 295 nm (emisión preferentemente de los triptófanos) en un espectrofotómetro Aminco Bowman series 2. El ancho de rendija utilizado tanto para el haz de excitación como de emisión fue de 4 nm y la velocidad de barrido en la obtención de los espectros fue de 2 nm por segundo. Los espectros obtenidos fueron corregidos respecto a sus correspondientes blancos (en el caso de las muestras dializadas se utilizó como blanco el tampón de diálisis). Los espectros fueron además normalizados tomando como referencia la emisión recogida a partir de 380 nm, región que resulta equivalente en los espectros excitando a 275 y a 295 nm. La contribución de las tirosinas al espectro se calculó restando el espectro de emisión de los triptófanos ( $\lambda_{exc} = 295$  nm) al total de la proteína ( $\lambda_{exc} = 275$  nm).

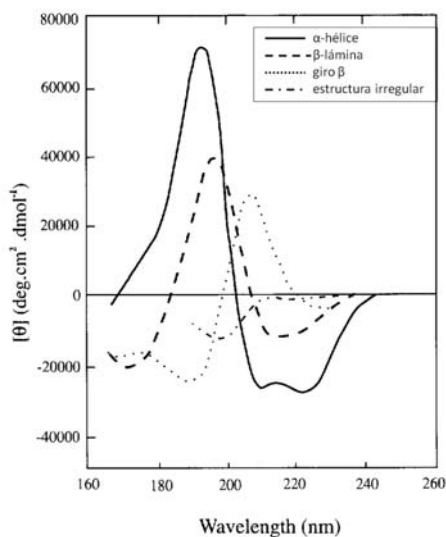
Además de la longitud de onda del máximo de emisión, se calculó el centro espectral de masas mediante la fórmula  $SCM = \Sigma(\lambda \cdot F) / \Sigma F$ .

### **3.4.3. Dicroísmo circular**

Un rayo de luz polarizada (cuyo campo eléctrico oscila sólo en un plano determinado) puede estar formado por dos componentes polarizados circularmente, uno a la derecha y otro a la izquierda, de la misma amplitud y desfasados 90°. Al pasar por un medio ópticamente activo (quiral) por razones de estructura, cada componente interactúa de manera diferente con los centros quirales de las moléculas presentes. La interacción de la radiación con la muestra induce un desfase y un cambio de magnitud diferenciales en ambos componentes circularmente polarizados de la luz, lo que provoca una rotación del plano de polarización en un ángulo definido (Kelly y Price, 1997).

La rotación del plano y la diferente absorción de los componentes circularmente polarizados (dicroísmo circular) varían de acuerdo con la longitud de onda, pudiéndose obtener espectros de estos fenómenos, esto es, gráficas que representan la rotación o elipticidad en función de la longitud de onda. Los espectros de dicroísmo circular se obtienen generalmente en las regiones del ultravioleta cercano (250 a 350 nm) y lejano (180 a 250 nm) de la radiación electromagnética. En la región del ultravioleta cercano los cromóforos más importantes son los grupos aromáticos de las cadenas laterales de triptófano, tirosina y fenilalanina. Considerando que la asimetría en estos grupos químicos se debe exclusivamente a su entorno y dado que los residuos aromáticos se

encuentran distribuidos en toda la macromolécula, los espectros en esta región son un reflejo de la conformación global de la proteína. Los espectros de dicroísmo en la región del ultravioleta lejano se deben principalmente a los enlaces amida que unen los residuos de los aminoácidos. La asimetría de estos cromóforos se debe a la disposición espacial de la cadena principal de la proteína, por lo que las señales en esta zona se pueden interpretar en términos del contenido de estructura secundaria presente. Cada uno de los elementos de estructura secundaria que forman parte de las proteínas ( $\alpha$ -hélices, giros  $\beta$ , estructuras aperiódicas) presentan bandas de absorción dicroica características en la región de 190-250 nm (figura 33). Las proteínas con estructura secundaria fundamentalmente helicoidal presentan una banda de marcada elipticidad negativa a 222 nm, otra a 208 nm y otra de elipticidad positiva cercana a los 192 nm (las dos últimas de intensidad dependiente de la longitud media de los segmentos helicoidales). El espectro de dicroísmo de las láminas  $\beta$  origina una banda de elipticidad negativa cercana a los 216 nm y una positiva entre 195 y 200 nm (Pelton y McLean, 2000).



**Figura 33.** Bandas de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano de los principales componentes de estructura secundaria de las proteínas (Pelton y McLean, 2000).

En este trabajo, se obtuvieron espectros de dicroísmo circular de las fracciones de proteína obtenidas mediante la cromatografía de intercambio iónico, una vez dializadas frente a LPC, y de los controles que se detallan en el apartado 3.4.1. Los espectros se recogieron en el ultravioleta lejano entre 260 y 190 nm, en un espectropolarímetro Jasco 715. Se recogieron 5 barridos de cada muestra, y los datos se analizaron con el programa Spectra Manager y el paquete CDPro.

### **3.4.4. Centrifugación analítica**

Los complejos proteicos obtenidos a partir de la cromatografía de intercambio iónico se sometieron a un experimento de **velocidad de sedimentación**, en el laboratorio del Dr. Germán Rivas de Ultracentrifugación Analítica e Interacciones Macromoleculares del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC (Madrid). En este experimento las proteínas se someten a un campo centrífugo elevado en el que la fuerza de centrifugación es mayor que la de difusión, existiendo un transporte neto de material hacia el fondo, lo que permite fraccionar las partículas existentes en base a sus diferencias en el coeficiente de sedimentación, que depende de la masa, densidad y forma de la partícula. De esta manera es posible determinar el coeficiente de sedimentación a partir del cual se puede obtener la masa molecular relativa de la partícula o complejo.

### **3.5. Técnicas de microscopía**

#### **3.5.1. Microscopía de fuerza atómica**

En la microscopía de fuerza atómica (AFM) las imágenes se obtienen midiendo los cambios en la magnitud de la interacción entre una punta fina y la superficie de la muestra que se mueve por debajo de ella. La resolución de estas imágenes por tanto depende en parte de la agudeza de la punta y de la precisión del tubo piezoeléctrico que mueve la muestra bajo la punta. Con esta técnica se pueden obtener imágenes topográficas de la superficie de la muestra, con resoluciones de pocos nanómetros en el plano horizontal y menos de 1 nm en el eje vertical usando dos modos diferentes. En el modo *de contacto*, la punta contacta con la superficie de la muestra mientras realiza el barrido, mientras que en el modo *tapping* la punta se hace vibrar sobre ésta registrándose los cambios en la amplitud de la vibración producidos como consecuencia del contacto con la muestra, que pueden ser interpretados en términos de información topográfica. Esta segunda opción es preferible para el estudio de las muestras biológicas ya que evita el arrastrar la punta sobre la muestra, minimizando así la posible perturbación de su estructura como consecuencia de la propia observación.

Mediante esta técnica se observaron los complejos obtenidos a partir de la centrifugación en gradiente de densidad del surfactante solubilizado con CHAPS. Para ello se depositó una gota de la muestra sobre un parafilm limpio y sobre la gota se colocó un soporte de mica recién exfoliada. Tras esperar 10 minutos se lavó la mica 2 veces durante 2 minutos cada uno con una gota de agua destilada. Los soportes de mica con las muestras se dejaron secar y se llevaron a un microscopio Nanoscope IIIa Multimode de Veeco para recoger imágenes en modo *tapping*, con puntas RTESP (Veeco). Las imágenes fueron tomadas por el **Dr. Luis Vázquez**, del Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid (CSIC).



### **3.5.2. Microscopía electrónica**

La microscopía electrónica de transmisión se utilizó para analizar dos tipos de muestras: las partículas obtenidas a partir de la centrifugación en gradiente de densidad, y las obtenidas a partir de la cromatografía de intercambio iónico.

Para las partículas obtenidas mediante la centrifugación en gradiente de densidad se depositó una gota de muestra en un parafilm sobre el que se colocó una rejilla de cobre cubierta de carbono durante 2 minutos. Tras 3 lavados con agua, la muestra se expuso a un agente de contraste colocando la rejilla sobre una gota de acetato de uranilo durante 30 segundos, y posteriormente se dejó secar. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio electrónico JEOL 1230 en el laboratorio de Microscopía Electrónica y Reconstitución Tridimensional de Macromoléculas del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC (Madrid) con la ayuda del **Dr. Óscar Llorca**.

Para la visualización de las partículas obtenidas de la cromatografía de intercambio iónico se realizó una tinción negativa de las muestras. Tanto la obtención de las imágenes de microscopía como su posterior procesamiento se desarrollaron con la colaboración de la **Dra. Begoña García**. Para estas muestras se utilizaron rejillas de cobre-paladio de 400 agujeros (Gilder Grids) sobre las que se depositó por flotación una película de carbono, y que fueron sometidas a una descarga iónica durante 30 segundos para favorecer la adsorción de la muestra. A continuación se incubó la rejilla con entre 3 y 5  $\mu\text{L}$  de muestra (con una concentración de proteína de 0.05 mg/mL) durante 2 minutos, se secó ligeramente con papel de filtro y se lavó dos veces con agua miliQ, secando también el exceso tras los lavados. La tinción se realizó con acetato de uranilo al 1-2% (p/v) durante 1 minuto, retirando posteriormente el exceso de agente de tinción y dejando secar al aire. Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1230, y se tomaron imágenes con una cámara TemCam-F416 CCD a una magnificación de 30,000 aumentos, mediante la técnica de “mínima dosis” para preservar la mayor cantidad posible de información estructural. Con este objeto, el área de interés se expone a una dosis de electrones igual o menor a  $10\text{ e}^-/\text{\AA}^2$  una sola vez a alta magnificación.

Tras descartarse las fotografías defectuosas (mediante el cálculo de la transformada de Fourier para cada imagen), las partículas fueron separadas en grupos en función de su similitud. Tras realizarse un promediado de las partículas dentro de cada grupo, se creó un volumen tridimensional de las partículas considerando los dos tipos diferentes de medias como vistas laterales y superiores del mismo tipo de partículas.

## **3.6. Ensayos de caracterización funcional del surfactante pulmonar**

### **3.6.1. Reconstitución de las partículas purificadas con detergente en vesículas de lípido para su caracterización funcional**

Para la reconstitución de muestras destinadas a la caracterización funcional en el surfactómetro de burbuja cautiva, el detergente se eliminó mediante incubación con

partículas de poliestireno **Bio-Beads** SM (Bio-Rad). Una vez incubada la proteína con los lípidos de la manera descrita más adelante (preparación de las muestras para CBS, sección 3.6.3) se añadieron a cada muestra 10 mg de Bio-Beads por cada mg de detergente y se incubaron durante a 1 hora con agitación. Posteriormente, se traspasó la muestra a otro tubo con la misma cantidad de Bio-Beads y se incubó durante una hora más. Finalmente, las muestras se incubaron durante toda la noche a 4°C con 20 mg de Bio-Beads por cada mg de detergente.

### 3.6.2. Ensayos de extensión o *spreading*

Los ensayos de *spreading* se realizaron en una balanza de Wilhelmy compuesta por una cubeta de teflón en la que se introduce una subfase acuosa sobre la que se deposita el material tensioactivo a estudiar (figura 34). Un sensor de presión situado en el extremo opuesto al de aplicación de la muestra de surfactante detecta los cambios en la tensión superficial ( $\gamma$ ), a medida que se produce la adsorción de material en la interfase y su rápido desplazamiento hacia la zona donde se encuentra el detector. En las isothermas de adsorción ( $\pi$ -t) se representa normalmente la presión superficial ( $\pi$ ) calculada como la diferencia entre la tensión superficial de la subfase acuosa antes y después de aplicar las muestras.



**Figura 34.** Esquema de la balanza de Wilhelmy utilizada para los ensayos de spreading.

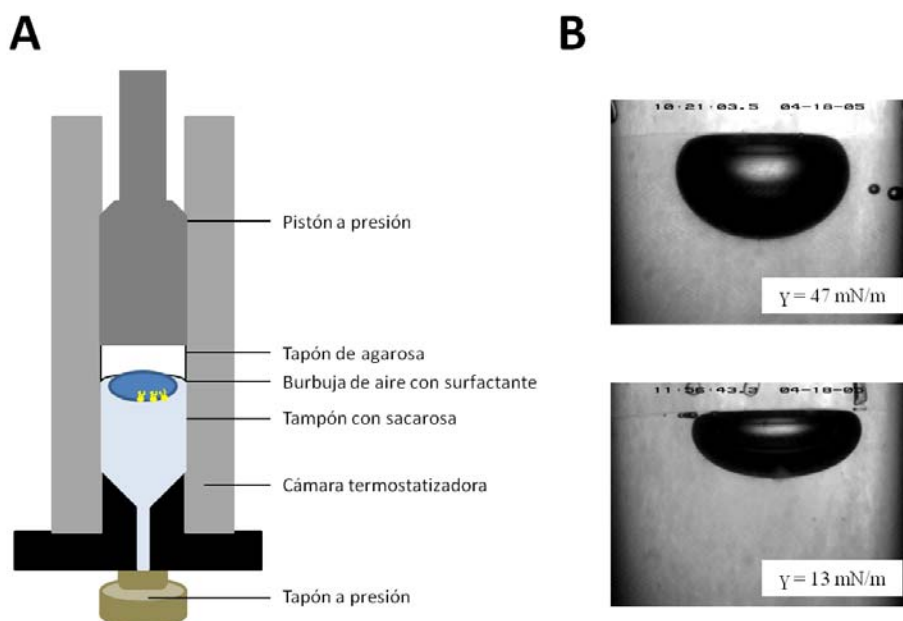
La capacidad de las muestras de surfactante pulmonar de ratas control e hipóxicas para formar películas interfaciales tensioactivas se evaluó midiendo su capacidad de extenderse y adsorberse a lo largo de una interfase aire-líquido en una balanza NIMA especialmente diseñada, con un volumen de subfase de 15 ml de tampón Tris 5 mM pH 7, NaCl 150 mM. Las muestras se depositaron sobre el medio acuoso con una microjeringa y se registró inmediatamente el incremento de la presión superficial mediante una bandera de papel acoplada al sensor de presión. En los experimentos

típicos, se estudiaron las cinéticas de incremento de la presión superficial con el tiempo tras la aplicación de distintas concentraciones de lípido en la muestra.

### 3.6.3. Surfactómetro de burbuja cautiva

Como se ha mencionado en el apartado 1.7 de esta Tesis, el surfactómetro de burbuja cautiva (CBS) permite evaluar la funcionalidad de un surfactante en condiciones que simulan la geometría y dinámica alveolar, ya que simula los ciclos respiratorios del alveolo durante la inspiración y espiración en condiciones de temperatura y humedad similares a las naturales. Además permite el estudio de muy pequeñas cantidades de material.

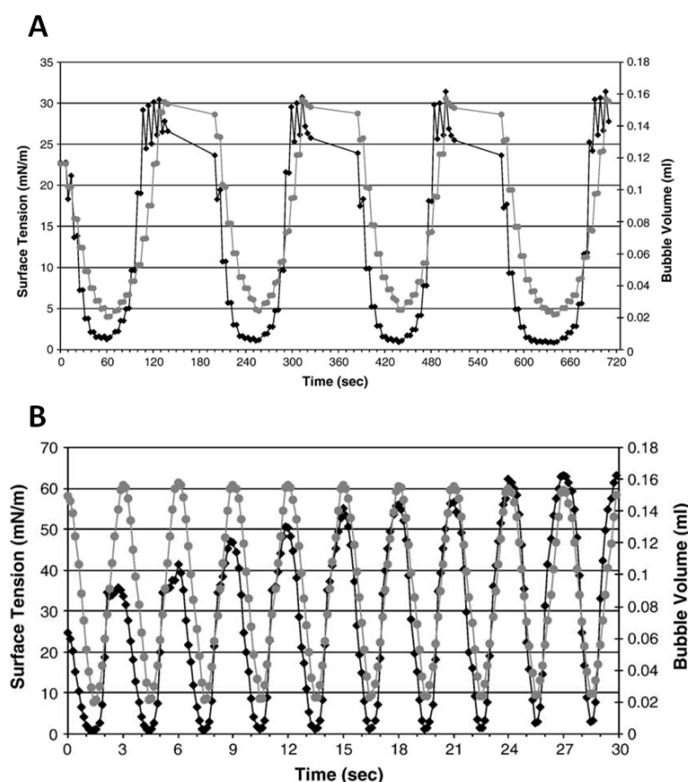
En el interior de una cámara conteniendo tampón Tris 5mM pH 7, NaCl 150 mM se crea una burbuja de aire que flota contra un techo hidrofílico constituido por un tapón de agarosa (figura 35A). El surfactante es inyectado a la solución acuosa (que contiene sacarosa 10% (p/v) para que el material flote hacia la burbuja) quedando así en la interfase aire-líquido (burbuja-tampón). El volumen de la burbuja se controla variando la presión en la cámara, de manera que al reducir su volumen disminuye el área en la superficie aire-líquido y viceversa, pudiendo así registrarse los cambios de tensión superficial inducidos por los ciclos de compresión y expansión (Schurch et al., 2001). La reducción de la tensión superficial hace que la burbuja pase de una forma más esférica a otra más plana, de manera que la tensión superficial se evalúa a partir del cambio de forma de la burbuja, monitorizado a partir de una película de video tomada mediante una cámara digital acoplada (Schoel et al., 1994) (figura 35B).



**Figura 35.** Esquema del surfactómetro de burbuja cautiva utilizado (A) y ejemplo de cómo la forma de la burbuja cambia en función de la tensión superficial (B).

El CBS permite realizar distintos tipos de experimentos:

- Evaluación de la **adsorción interfacial inicial** del surfactante en forma de cinéticas de disminución de  $\gamma$  en función del tiempo desde el mismo momento de su inyección en la subfase.
- Evaluación de la **adsorción de material a la nueva interfase que se abre tras una expansión de la burbuja** una vez se ha completado la adsorción inicial.
- Análisis del comportamiento de las películas interfaciales durante los **ciclos cuasiestáticos**, en los que se produce la compresión y expansión de la burbuja en etapas discontinuas que intercalan periodos de reposo durante los que se permite la relajación de las películas.
- Análisis del comportamiento de las películas durante los **ciclos dinámicos**, en los que la compresión y expansión de la burbuja se produce de forma continuada, sin tiempos de espera entre los ciclos, y a una velocidad de 20 ciclos/minuto, comparable a la dinámica respiratoria (figura 36).



**Figura 36.** Ilustración de los cambios en el volumen de la burbuja (líneas grises) y los consecuentes cambios en la tensión superficial (líneas negras) durante los ciclos cuasiestáticos (A: 4 ciclos cuasiestáticos con pasos de 3 segundos y demoras de 4 segundos entre cada paso y de 1 minuto entre ciclos) y dinámicos (B: 10 ciclos dinámicos a 20 ciclos por minuto) en un experimento de surfactómetro de burbuja cautiva. Tomado de (Gunasekara et al., 2005).

## Preparación de las muestras

Los experimentos en el CBS permitieron evaluar la actividad surfactante de las **partículas proteicas obtenidas a partir de la columna de intercambio iónico** una vez reconstituidas en forma de complejos lipoproteicos libres de detergente. Para ello las proteínas se reconstituyeron en los siguientes sistemas:

- Mezcla sintética **DPPC/POPC/POPG (50:25:15)** (p/p/p)
- Mezcla **DPPC/POPC/POPG (50:25:15)** (p/p/p) **con SP-C 0.6%** (p/p) (SP-C purificada a partir del extracto orgánico del surfactante).
- **Fracción lipídica del surfactante** (desproteinizada mediante la cromatografía LH-20, tal y como se describe en el apartado 3.1.1.3)
- **Fracción lipídica del surfactante con SP-C 0.6%** (p/p).

La concentración de proteína utilizada fue de 1% (p/p) respecto al lípido para la SP-B purificada en disolvente orgánico, y de 3% (p/p) en el caso de la proteína obtenida mediante solubilización con CHAPS. Las concentraciones de proteína mencionadas fueron elegidas tras ensayar diferentes proporciones de proteína (0.5, 1 y 2% para la SP-B en disolvente orgánico, y 1, 2 y 3% para la proteína obtenida con detergente).

La reconstitución de la proteína en cada una de las mezclas lipídicas indicadas se realizó de dos maneras diferentes:

- **Interacción de las proteínas con membranas preformadas:** se secó el lípido (con o sin SP-C) y se resuspendió con tampón Tris 5 mM pH 7, NaCl 150 mM. Estas suspensiones se utilizaron para formar vesículas unilamelares grandes (LUVs) mediante extrusión a través de membranas de policarbonato con un tamaño de poro de 100 nm. **Una vez formadas las LUVs se les añadió la proteína** al 3 % (p/p) y tras su incubación durante 1 hora a 37°C se procedió a eliminar el detergente mediante la utilización de Bio-Beads tal y como se describe en el apartado 3.6.1. Además se realizaron controles en los que se añadió el tampón de la columna de intercambio iónico (sin proteína) para comprobar que tras la utilización de Bio-Beads las posibles trazas de detergente restantes no tengan un efecto en la tensioactividad.
- **Reconstitución de membranas en presencia de las proteínas:** se secó el lípido (con o sin SP-C) y **se resuspendió directamente en una solución que contiene la proteína** al 3 % (p/p), para obtener directamente suspensiones lipoproteicas **multilamelares**. Como control, se resuspendió el lípido directamente con tampón de elución de la columna. Posteriormente se eliminó el detergente mediante utilización de Bio-Beads.

Tras la eliminación del detergente las muestras fueron concentradas mediante ultracentrifugación (100,000xg, 1 hora a 4°C) para lograr una concentración final de lípido de aproximadamente 25 mg/ml.

Para comparar la actividad de la proteína purificada con detergente con la de la **SP-B purificada en disolvente orgánico**, se realizaron preparaciones de los mismos lípidos (con o sin SP-C) a los que se añadió SP-B 1% purificada a partir del extracto orgánico, y tras el secado del disolvente orgánico de la mezcla lipoproteica se llevó a cabo su rehidratación formando **suspensiones multilamelares**.

### **Desarrollo del experimento de CBS**

Se utilizaron tapones de agarosa 1% y para la subfase se preparó tampón Tris 5mM pH 7, NaCl 150 mM, sacarosa 10%. Los experimentos se realizaron a 37°C previa desgasificación del tampón durante 10 minutos mediante la formación de una burbuja expandida con la cámara cerrada, y la posterior eliminación del aire acumulado en la cámara.

Una vez formada una burbuja de aire de 50  $\mu$ L en el tampón desgasificado, un volumen de aproximadamente 0.1  $\mu$ L de las muestras fue inyectado en la subfase registrando cinéticas de adsorción inicial durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo se cerró la cámara y se procedió a expandir la burbuja hasta un volumen de 0.15 mL, registrándose la adsorción post-expansión durante otros 5 minutos. Tanto en la adsorción inicial como en la adsorción post-expansión se analizaron las cinéticas de reducción de la tensión superficial determinando su caída a los 0, 1, 5, 20, 60, 180 y 300 segundos post-inyección o post-expansión. La adsorción a tiempo 0 y tiempo 1 se calcula a partir de las imágenes de la burbuja en el momento inmediatamente anterior e inmediatamente posterior, respectivamente, a la introducción de la muestra en la cámara del CBS.

A continuación se realizaron 4 ciclos cuasiestáticos de compresión-expansión, fijando el volumen máximo de la burbuja en 0.15 ml (lo que supone una expansión de la burbuja de aproximadamente 2 a 6 mm de diámetro), y deteniendo la compresión en un volumen mínimo determinado manualmente antes de que se produzca el colapso de la burbuja. Los ciclos cuasiestáticos se desarrollaron con intervalos de 4 segundos entre cada etapa de compresión o expansión, y un reposo de 1 minuto entre cada uno de los cuatro ciclos. Finalmente se registraron 20 ciclos dinámicos a una velocidad de 20 ciclos por minuto, utilizando los ciclos 1, 10 y 20 para la graficación de los resultados.

### **3.7. Evaluación de la difusión de oxígeno a través de surfactante mediante la utilización de capilares con sonda fluorescente**

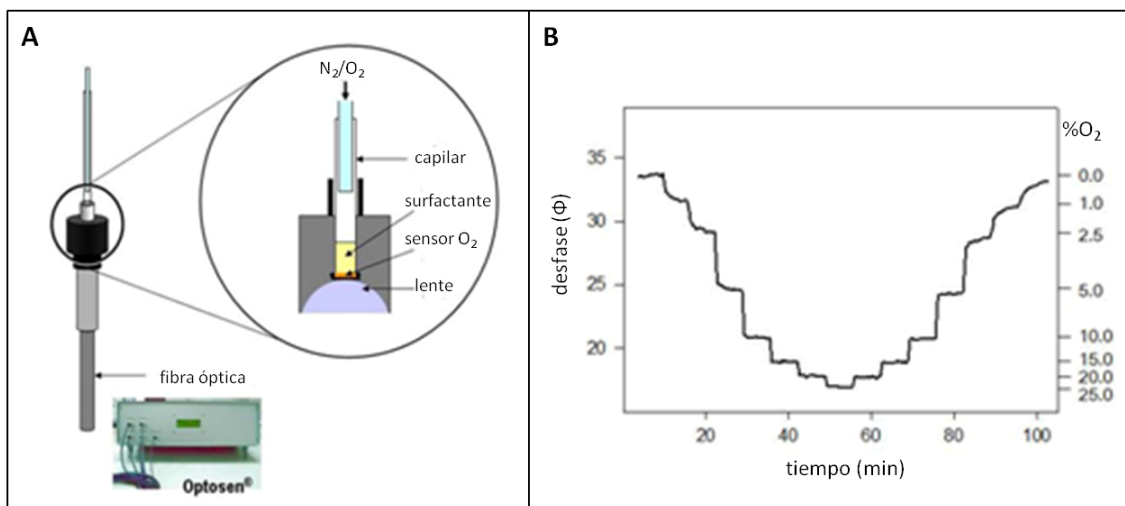
Este método fue desarrollado en el laboratorio del **Dr. Guillermo Orellana**, del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química de la Universidad Complutense de Madrid.

Como sensor de oxígeno se utilizó la sonda luminiscente tris (4,7-diphenil-1,10-phenanthroline) ruthenium (II) (**RDP3**), sintetizada en el laboratorio del Dr. Orellana. Su fluorescencia a 610 nm es altamente sensible a las variaciones en la concentración de oxígeno ya sea en solución o en fase gaseosa. La sonda fue embebida en una membrana

de silicona que se colocó en el fondo de un capilar de vidrio de 1.5 mm de diámetro interno (figura 37A). La emisión en rojo del sensor se recoge en una fibra óptica que a su vez dirige la luz de excitación azul desde un LED a la muestra, y que se encuentra conectada al fluorímetro OPTOSEN® (Interlab). La fluorescencia del sensor responde rápidamente a los incrementos o disminuciones de la proporción de oxígeno, obteniéndose medidas precisas del cambio de fase producido por el apagamiento del tiempo de vida media de la emisión de la sonda debido al oxígeno (figura 37B). La proporción de oxígeno en el flujo de aire que pasa a través del capilar (que está además equilibrado a 37°C) se regula de manera precisa mediante un mezclador de gases ( $N_2$  y  $O_2$ ).

Las muestras a través de las cuales se midió la velocidad de difusión de oxígeno incluyeron surfactante pulmonar porcino, y suspensiones preparadas a partir del extracto orgánico del surfactante, su fracción lipídica o el lípido sintético DPPC (Avanti Polar Lipids, USA) en tampón Tris 5 mM pH 7, NaCl 150 mM. Un volumen de 5  $\mu$ l de muestra a una concentración de lípido de 16 mg/ml se depositó en el capilar sobre la película de sonda, y salvo en las ocasiones en que se indica lo contrario, el capilar fue centrifugado durante 5 minutos a 3000g para facilitar la concentración del material sobre la película de sonda, eliminándose el volumen sobrante (aproximadamente 2  $\mu$ l), siendo la concentración final de lípido en el capilar de 27 mg/ml.

El capilar con la muestra se colocó en una cámara sobre la lente colectora de fluorescencia y se hizo pasar un flujo de aire húmedo saturado de nitrógeno. Una vez que el cambio de fase quedó equilibrado en el máximo, la proporción de oxígeno en el aire se aumentó al 25%, monitorizándose el decaimiento de la fluorescencia con el tiempo.



**Figura 37.** Diseño experimental utilizado para estudiar la difusión de oxígeno a través del surfactante (A) y calibración de la sonda mediante exposición a menores o mayores proporciones de oxígeno en el aire indicadas a la derecha de la gráfica (B).

### 3.8. Generación de un modelo de la estructura tridimensional de la proteína SP-B, basado en la estructura de la saposina B

La generación de un modelo estructural para la SP-B pudo realizarse gracias a la colaboración del **Dr. Manuel José Gómez**, de la Unidad de Secuenciación y Bioinformática del Centro de Astrobiología (CAB) del INTA-CSIC, Madrid.

El alineamiento de las secuencias de SP-B y saposina B se realizó a partir de un alineamiento múltiple de secuencia para la familia SapB obtenido de SMART. Dicho alineamiento se sometió al programa Swiss-model (modo *Swissmodel alignment*) para predecir la estructura tridimensional de la SP-B utilizando como molde las variantes estructurales A y B de la saposina B (PDB 1N69).

Para llevar a cabo la predicción estructural del dímero de SP-B, se utilizaron como molde las estructuras diméricas de la saposina B. Para obtener el molde correspondiente a la estructura del dímero cerrado de la saposina B a partir del archivo original PDB 1N69 (que contiene la estructura del dímero cerrado AB y una cadena C adicional) se creó un archivo PDB conteniendo únicamente el dímero cerrado AB. Para la obtención del molde estructural correspondiente al dímero abierto CC' de la saposina B, se realizó la transformación cristalográfica de dicha cadena, considerando que el cristal de saposina B pertenece al grupo espacial de simetría  $P3_121$ , y aplicando en concreto la transformación  $-x, y-x, 1/3-z$ , que reconstruyó el homodímero abierto de la proteína. Una vez obtenidos los moldes AB y CC', cada uno de los dos modelos de dímeros de SP-B (uno abierto y otro cerrado) se construyeron a partir de los moldes y de dos secuencias de la SP-B en tándem, mediante el empleo del programa Swiss PDB Viewer para realizar el *threading*, y ajustando posteriormente de manera manual el alineamiento de las secuencias de saposina B y SP-B según el alineamiento empleado para la modelización de los monómeros. Finalmente se llevó a cabo la predicción de la estructura de los dímeros de SP-B sometiendo el proyecto creado en Swiss PDB Viewer al programa Swiss-model (modo *Swissmodel Project*).

Por último, para la predicción estructural de los oligómeros supradiméricos de la SP-B, se llevó a cabo el *docking* con simetría radial de los dímeros modelizados de SP-B, tanto abiertos como cerrados, mediante el empleo del programa M-ZDOCK. El refinamiento de las estructuras obtenidas se realizó teniendo en cuenta un *score* combinado basado en la puntuación obtenida respecto al *docking* y en las distancias que permiten la formación del puente disulfuro intermolecular entre las Cys48 (2.4 Å entre los azufres gamma), y de los puentes de hidrógeno y puente salino entre el Glu51 y la Arg52 (10 Å) (Zaltash et al., 2000).

El ajuste del modelo atómico de SP-B en el volumen obtenido a partir de las imágenes de microscopía se realizó utilizando como herramienta de ajuste el programa *ADP\_EM\_Fast rigid-body fitting* (Garzon et al., 2007).



**MODELIZACIÓN DE LA ESTRUCTURA  
TRIDIMENSIONAL DE LA SP-B BASADA EN LA  
ESTRUCTURA DE LA SAPOSINA B**



## **4. MODELIZACIÓN DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LA SP-B BASADA EN LA ESTRUCTURA DE LA SAPOSINA B**

### **4.1. INTRODUCCIÓN**

La SP-B es una proteína esencial para la estructura y función del surfactante pulmonar, y esencial por tanto para la vida (Nogee, 1998). La SP-B pertenece a la familia SAPLIP o proteínas tipo saposina, todas ellas caracterizadas por poseer un patrón típico de 3 puentes disulfuro intramoleculares que les confieren gran estabilidad, una estructura secundaria mayoritariamente helicoidal, y una capacidad común de unión a lípidos (Munford et al., 1995). No obstante, en el caso de la SP-B la formación de un dímero covalente por la existencia de una cisteína extra, su naturaleza hidrofóbica y su asociación constante a lípidos, no sólo transitoria, constituyen diferencias importantes en relación a las demás proteínas de la familia.

Debido a la dificultad del estudio de la SP-B por su naturaleza altamente hidrofóbica, su estructura tridimensional no ha sido todavía resuelta, aunque se han propuesto diferentes modelos estructurales tomando como base la estructura conocida de otras proteínas de la familia SAPLIP. Por ejemplo, se ha sugerido que la SP-B podría adoptar una estructura formada por 5  $\alpha$ -hélices anfipáticas similar a la estructura obtenida por NMR de la NK-lisina (Zaltash et al., 2000).

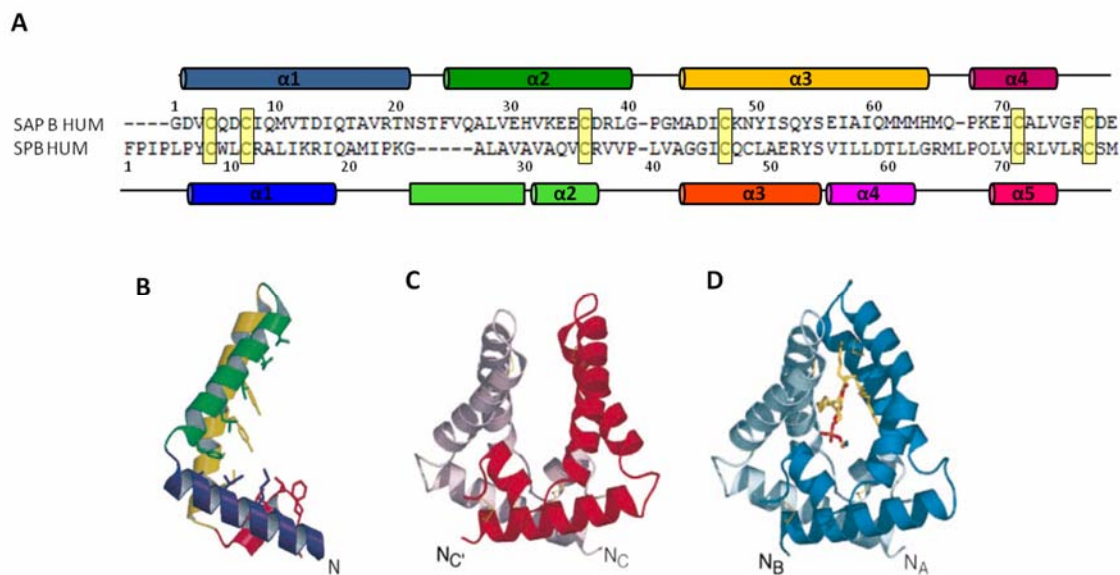
En este capítulo se presenta un modelo de la estructura tridimensional de la SP-B basado en la estructura de una de las proteínas de la familia, la saposina B. La estructura de esta proteína fue resuelta mediante cristalización y difracción de rayos X (Ahn et al., 2003), revelando la existencia de dímeros en forma de pinza, que gracias a dos conformaciones distintas, abierta y cerrada, serían capaces de llevar a cabo su función como cofactor de esfingolipasas mediante la captura de los lípidos en su cavidad hidrofóbica. La homología existente entre la SP-B y las saposinas es tan alta como la existente entre las distintas isoformas de saposinas entre sí (ver figura 22 del apartado de Introducción) (Kishimoto et al., 1992). De esta forma, los dos únicos residuos estrictamente conservados entre las isoformas de las saposinas, una tirosina en el lazo entre las hélices 3 y 4 y una prolina en el inicio de la hélice 5, lo están también en la SP-B (Bruhn, 2005). Esta gran homología, junto con la existencia de dimerización en la saposina B, parece sugerir una estructura similar de ambas proteínas.

La utilización de la estructura de la saposina B como base para generar un modelo de la estructura tridimensional de la SP-B, predijo una organización supramolecular para esta proteína mucho más compleja que la supuesta hasta el momento y que resulta compatible con sus características estructurales y funcionales. Así mismo, la estructura predicha podría además suponer un modelo común para otras proteínas tipo saposina, que unificaría la estructura de los distintos miembros de esta familia, que presenta un abanico muy amplio de funciones.

## 4.2. RESULTADOS

### 4.2.1. Modelo del dímero de la SP-B

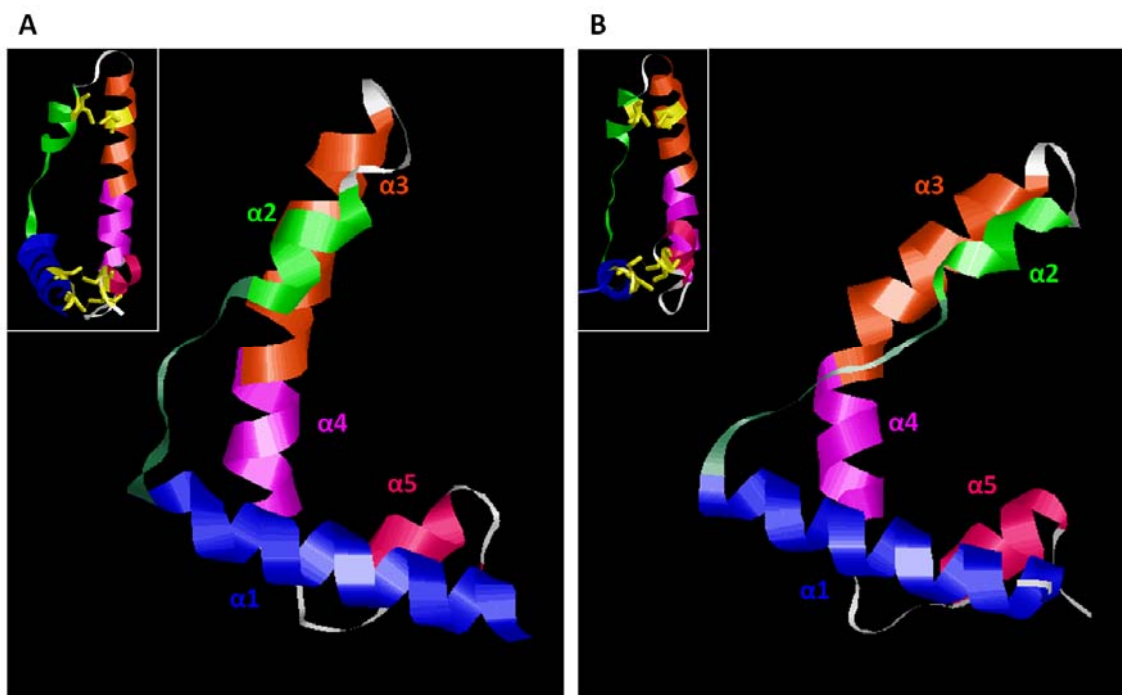
En la figura 38A se muestra el alineamiento de las secuencias de la saposina B y la SP-B utilizado para la generación de las estructuras tridimensionales de la SP-B, empleando como molde los plegamientos estructurales de las dos variantes conformacionales descritas para el monómero de saposina B.



**Figura 38.** A. Alineamiento de las secuencias de la saposina B y la SP-B humanas utilizado para la predicción estructural realizada mediante Swiss-model. Los cilindros representan las  $\alpha$ -hélices determinadas por la cristalización de la saposina B (arriba) y las predichas por el modelo de la SP-B (abajo). Las cajas en amarillo indican la conservación estricta de las 6 cisteínas que dan lugar a 3 puentes disulfuro intramoleculares. En **B** se muestra la estructura de la cadena A de la saposina B, en **C** la estructura del dímero CC' (abierto) de dicha proteína y en **D** la estructura del dímero cerrado AB (Ahn et al., 2003).

Los monómeros de saposina B consisten en 4  $\alpha$ -hélices anfipáticas dispuestas en forma de V, estabilizada por 3 puentes disulfuro que conectan las hélices dos a dos (1-4 y 2-3), y en la que la parte cóncava interna está tapizada por aminoácidos hidrofóbicos (figura 38B). Las diferencias conformacionales entre los dos tipos de monómeros descritos para esta proteína (A, B y C, siendo iguales A y C) residen en la existencia de un acodamiento en la hélice 3 de la cadena B. La dimerización de la saposina B a partir de las cadenas C y C' da lugar por lo tanto a la formación de dímeros simétricos en los que la cavidad interior permanece abierta por un extremo de la estructura (figura 38C), mientras que los dímeros AB tienen una estructura asimétrica en la que el codo de la cadena B cierra la cavidad (figura 38D) (Ahn et al., 2003).

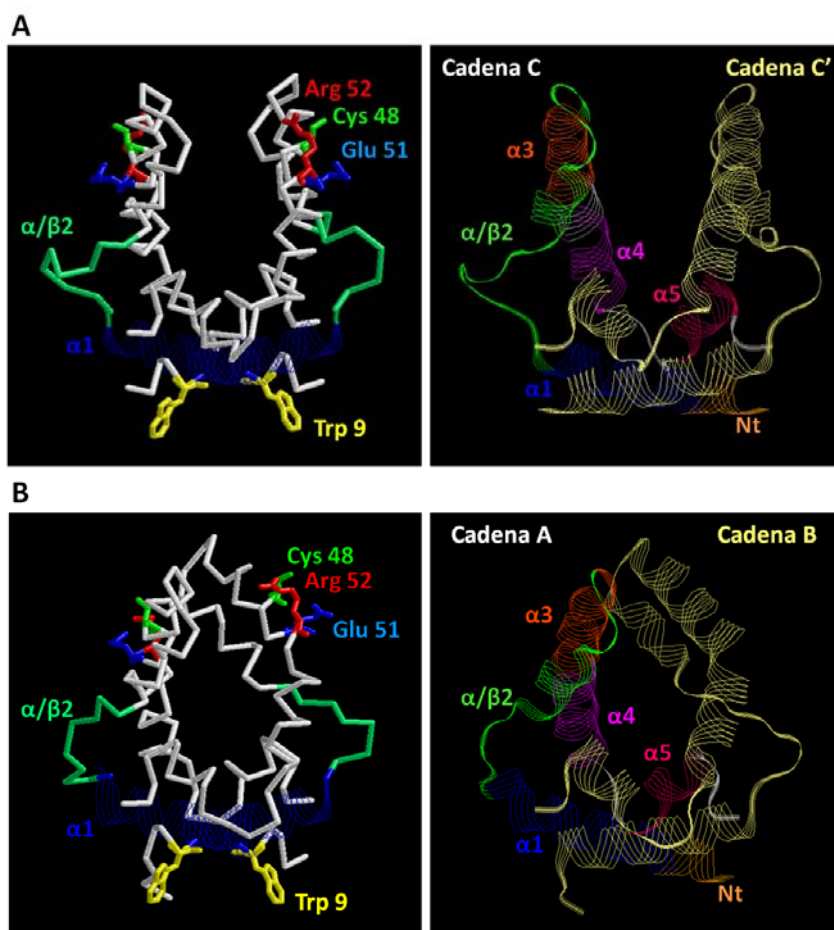
La estructura de las dos variantes conformacionales del monómero de SP-B obtenida mediante la modelización se muestran en la figura 39. En ella se muestran las 5  $\alpha$ -hélices que predice el modelo en el mismo código de colores de la figura 38A. Al igual que en el caso de la saposina B, la diferencia entre las variantes conformacionales del modelo de SP-B consiste en el acodamiento entre las hélices 3 y 4 de la cadena B. No obstante, a diferencia de la saposina B, en la estructura originada para el monómero de SP-B tiene lugar un desdoblamiento parcial de la hélice 2 en ambos monómeros, que según el modelo estaría por tanto precedida por una estructura desordenada. Tal y como se puede observar en el alineamiento de la figura 38A, parte de la secuencia de este segmento coincide con un hueco en la secuencia de la SP-B, lo que posiblemente no permita al programa predecir ningún tipo de estructura en esa zona. No obstante parte de la estructura desordenada de ese segmento en el modelo sí se encuentra alineada con la secuencia de la saposina B correspondiente a parte de la hélice 2, por lo que también es posible que en la SP-B esa estructura no sea realmente helicoidal.



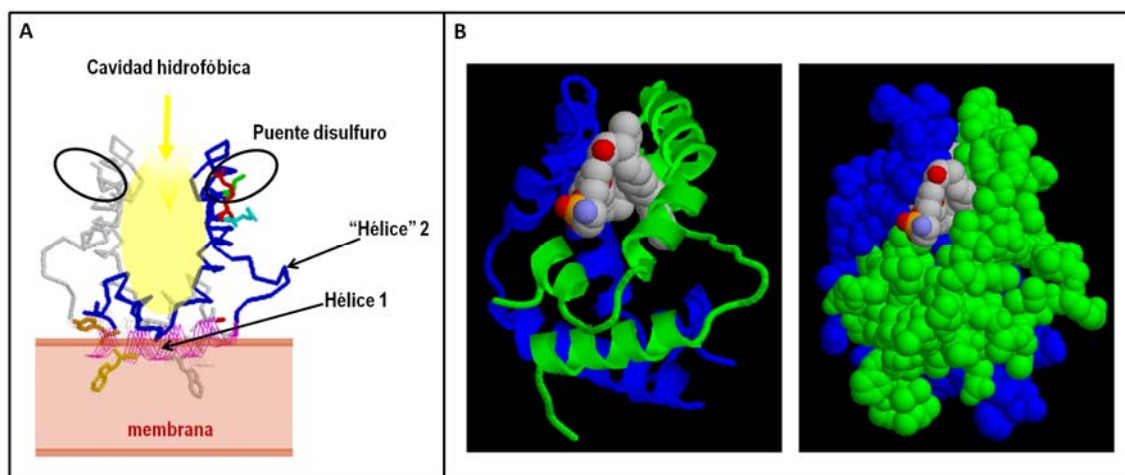
**Figura 39.** Modelo del monómero de SP-B basado en la estructura de la saposina B. La modelización a partir de las dos cadenas de la saposina B (A y B) dio como resultado dos variantes conformacionales de la SP-B: cadena A (**A**) y cadena B (**B**). En los detalles se señalan en amarillo las 6 cisteínas que forman los 3 puentes disulfuro intracatenarios que estabilizan el monómero.

En la figura 40 se muestra la estructura de las dos conformaciones posibles del dímero de SP-B basadas en las estructuras de los dímeros abierto (CC') y cerrado (AB) de la saposina B. Según esta estructura la asociación de los dos monómeros de SP-B se produciría de forma antiparalela a través de la primera  $\alpha$ -hélice de cada subunidad. Se

observa también que los triptófanos (W9) de cada monómero apuntarían hacia el exterior de la proteína, marcando de esta manera el plano con el que la proteína interaccionaría con la membrana mediante interacción de este residuo y en general del segmento amino terminal, así como de las hélices 1 de manera paralela a la membrana. El modelo predice además la existencia de una cavidad hidrofóbica generada por la disposición de las hélices anfipáticas de la proteína, de manera que sus residuos hidrofóbicos tapizan el interior de la cavidad (figura 41A). Para considerar la posibilidad de que en dicha cavidad pueda alojarse un fosfolípido, se incluyó un fragmento de fosfatidiletanolamina como el modelado por Ahn y colaboradores para la saposina B, en el modelo con el dímero cerrado de la SP-B. Tal y como se observa en la figura 41B no existirían impedimentos estéricos para la localización de dicho fosfolípido en la cavidad.



**Figura 40.** A. Modelo de las dos conformaciones del dímero de SP-B basadas en la estructura tridimensional de la saposina B: abierto (CC') en A y cerrado (AB) en B. En los paneles de la derecha se muestra la localización de las  $\alpha$ -hélices, mientras que en los paneles de la izquierda se resaltan los residuos más importantes de la proteína en cuanto a interacción con membranas (Trp 9) y en cuanto a la interacción proteína-proteína (Cys 48, Glu 51 y Arg 52).



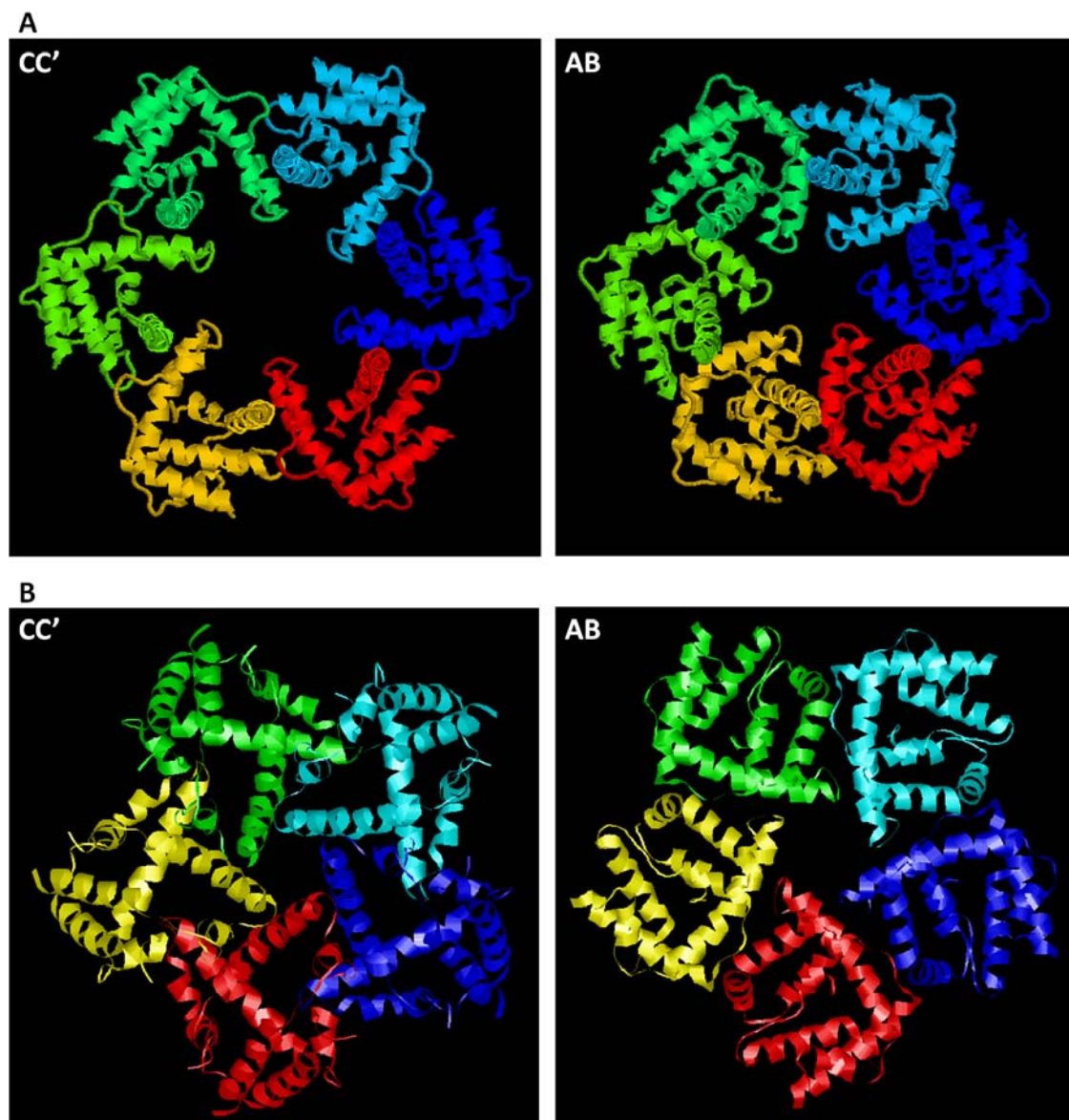
**Figura 41.** A. Esquema de cómo se produciría la interacción del dímero de SP-B con la membrana, a través de la hélice 1 y los aminoácidos aromáticos. B. Modelización de un fragmento de fosfatidiletanolamina en el dímero cerrado (AB) de la SP-B.

Tal y como se aprecia también en estas figuras, llama especialmente la atención la localización de las cisteínas 48 que forman el puente disulfuro intermolecular, de manera que según el modelo estas cisteínas quedarían situadas en posiciones opuestas del dímero, apuntando hacia el exterior de éste, al igual que los residuos de los puentes salinos glutámico 51 y arginina 52. Además, el fragmento inicialmente designado como *hélice 2* se encuentra también situado en las caras exteriores del dímero. La implicación de esta *hélice 2* en la formación de interacciones proteína-proteína (Ryan et al., 2005), al igual que la localización de los residuos implicados en la dimerización por fuerzas covalentes y electrostáticas, sugiere la oligomerización del dímero por la parte exterior con más subunidades de proteína, por lo que se procedió a modelizar la posible formación de oligómeros supradiméricos de SP-B.

#### 4.2.2. Modelo de la oligomerización supradimérica de la SP-B

Para satisfacer la formación de los puentes disulfuro intercatenarios se realizó un “docking” de dímeros. Las estructuras oligoméricas obtenidas en las que las distancias entre las Cys48 y entre Glu51/Arg52 permitían la formación de puentes disulfuro y de hidrógeno y salinos respectivamente, resultaron estar constituidas por 5 ó 6 dímeros de SP-B, siendo igualmente favorable, al menos con respecto a los datos de los ajustes, tanto la formación de pentámeros como de hexámeros de dímeros (figura 42).

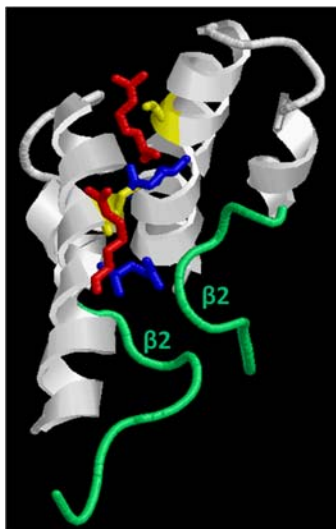




**Figura 42.** Modelo de un hexámero (A) y un pentámero (B) de dímeros de SP-B, en sus dos conformaciones abierta (CC') y cerrada (AB).

Según este modelo, la estructura oligomérica de la SP-B estaría constituida por un anillo de dímeros asociados entre sí por puentes disulfuro, puentes salinos e interacciones a través de las *hélices* 2, que en realidad adoptarían una conformación tipo  $\beta$  (figura 43). A su vez cada dímero no covalente estaría formado por asociación de dos monómeros de SP-B interaccionando a través de las hélices 1. La cavidad generada en cada uno de los dímeros no covalentes tendría una naturaleza hidrofóbica, y la asociación con la membrana de todo el complejo se realizaría a través de la interacción profunda de los residuos del extremo amino terminal, principalmente el triptófano 9, y de las hélices 1 de manera más superficial y paralela a la membrana.





**Figura 43.** Detalle de la interfase de interacción proteína-proteína formada por el puente disulfuro (en amarillo), los puentes salinos formados por Glu51/Arg52 y la interacción de la zona no helicoidal  $\beta 2$ .

### 4.3. DISCUSIÓN

#### *El dímero no covalente de la SP-B*

La utilización de la estructura del dímero de saposina B como molde para la generación de un modelo de la estructura de la SP-B dio como resultado una forma dimérica formada por la asociación de monómeros a través de las hélices 1, incompatible con la formación del puente disulfuro intercatenario que estabiliza el dímero de SP-B. Como solución a esta aparente contradicción, el modelo generado propone que los puentes disulfuro formados por las cisteínas 48 estarían implicados en realidad en la oligomerización de estos dímeros entre sí, para dar lugar a un gran complejo proteico formado por 5 ó 6 dímeros. Este modelo sería, por tanto, compatible con la existencia de los dímeros covalentes de SP-B, que hasta ahora se han supuesto como la estructura nativa de la proteína, de manera que los dímeros obtenidos mediante la purificación de la proteína con disolventes orgánicos constituirían en realidad asociaciones covalentes formadas por un monómero de cada dímero no covalente, cuya asociación habría sido destruida por la utilización de disolventes orgánicos.

Como en el caso de la saposina B la asociación de las hélices 1 antiparalelas podría darse mediante una interacción del tipo coiled-coil (Ahn et al., 2003). No obstante si se analiza detalladamente la secuencia de la SP-B se observa que ésta carece de la héptada típica de este tipo de estructura, que se caracteriza por la repetición de 7 residuos (abcdefg) en los que las posiciones 1 y 4 están ocupadas por aminoácidos hidrofóbicos y las posiciones 5 y 7 por residuos cargados (Mason y Arndt, 2004). Además, la escasa probabilidad de que la secuencia de la SP-B adopte estructuras del tipo coiled-coil (estimada mediante la utilización de los programas “COILS” y “PARCOIL2” [http://www.ch.embnet.org/software/COILS\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html); [95](http://groups.csail.</a></p></div><div data-bbox=)

mit.edu/cb/paircoil2/) sugiere que la asociación existente entre las dos  $\alpha$ -hélices amino terminal no es un “coiled-coil” canónico.

***La existencia de oligómeros de SP-B no es el resultado de una mera agregación inespecífica***

La existencia de formas supradiméricas de SP-B ha sido descrita anteriormente en numerosos estudios a lo largo de los años. La SP-B bovina forma trímeros (Hawgood et al., 1998), e incluso se han encontrado oligómeros mayores (hasta octámeros) de SP-B en disolvente orgánico purificada mediante HPLC (Bunger et al., 2001). Parece ser además que la formación de oligómeros de SP-B depende del disolvente empleado y de la concentración de proteína durante su almacenamiento, encontrándose la mayor proporción de formas supradiméricas en la proteína purificada en cloroformo/metanol en elevada concentración de proteína, respecto a la aislada en butanol (Wustneck et al., 2003; Wustneck et al., 2005). Otras evidencias que apuntan también a una fuerte **tendencia a la oligomerización** de la SP-B, se encuentran en estudios de la nanoestructura del surfactante, en los que se aprecia mediante microscopía de fuerza atómica la existencia de agregados de SP-B asociados a los límites de los dominios líquido condensados en monocapas de DPPC y DPPC/DPPG (Cruz et al., 2004). Por último, experimentos de formación de bicapas planas también sugieren la importancia de las interacciones SP-B/SP-B en el empaquetamiento de las membranas de surfactante que podrían tener una implicación en ciertas funciones de la proteína, como el empaquetamiento de los cuerpos lamelares, al requerirse la presencia de la proteína en ambos lados de la membrana (Cabre et al., 2009).

La tendencia de la proteína a la oligomerización estaría justificada por el modelo propuesto, y supondría la formación de complejos proteicos con estructura y estequiometría definidas, y no una mera agregación inespecífica de la proteína. Además esto explicaría la existencia de diversas formas supradiméricas de la SP-B, cuya aparición varía ampliamente en función de los métodos de purificación y manipulación empleados, que serían responsables de la alteración de la estructura nativa de la proteína provocando su disociación en último término hasta los dímeros estabilizados por los enlaces covalentes.

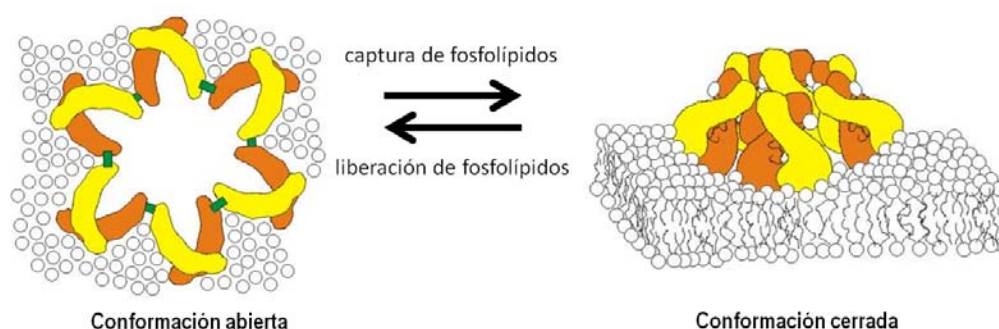
Como se ha comentado anteriormente la oligomerización supradimérica de la SP-B se produciría según este modelo a través del puente disulfuro formado por las cisteínas 48 de dos monómeros, y por la existencia de puentes salinos entre el glutámico 51 y la arginina 52, tal y como predijo también anteriormente el modelo de SP-B basado en la estructura de la NK-lisina (Zaltash et al., 2000). La oligomerización de los dímeros en el modelo aquí propuesto estaría también estabilizada mediante interacciones a través de las *hélices 2* que en realidad formarían una asociación tipo  $\beta$ . De hecho existen evidencias que apuntan a que este fragmento de la SP-B podría no poseer una estructura  $\alpha$ -helicoidal. La estimación del contenido en  $\alpha$ -hélice mediante dicroísmo circular y espectroscopía de infrarrojos (IRRAS) de péptidos basados en este fragmento, predice

un menor porcentaje de esta estructura para este segmento, lo que podría indicar una mayor flexibilidad estructural del péptido en comparación a la proteína completa, o bien una conformación en beta lámina antiparalela de esta región (Flach et al., 2003). El análisis mediante dicroísmo circular también es consistente con una conformación de tipo  $\beta$  para este segmento de la SP-B (Serrano et al., 2006), lo que reforzaría la predicción del modelo de la existencia de una interacción entre dos cadenas beta para formar una pequeña lámina en esta zona de la proteína.

Otra consecuencia del modelo supradimérico propuesto es que las supuestas regiones de interacción de la proteína con las bicapas o monocapas lipídicas de surfactante, a través de las hélices 1, se encontrarían dispuestas en el contorno periférico del anillo. La interacción de la proteína con la membrana no se basaría entonces en una interacción extensa de las caras hidrofóbicas de los segmentos helicoidales anfipáticos de la SP-B, como se ha venido proponiendo, pues estas superficies hidrofóbicas tapizarían más bien el interior de la cavidad del dímero. La interacción con las membranas consistiría fundamentalmente en una interacción superficial de las caras polares, catiónicas, de las hélices 1 y 5, con la superficie de bicapas y monocapas, aniónicas debido a la presencia de PG. La disposición topológica del plano del anillo de SP-B paralelo al plano de la membrana, haría que las hélices 1 fueran los segmentos de la proteína que interaccionan más profundamente con la bicapa.

El resultado de todas las interacciones entre dímeros que propone el modelo sería la inserción del complejo en la membrana de la manera que se muestra en la figura 44. Dado que la cavidad formada por cada dímero está tapizada con aminoácidos hidrofóbicos, cada dímero podría capturar un fosfolípido, de manera que una vez cargado el oligómero de lípidos se produciría un cambio conformacional que consistiría en un cierre del complejo, que como consecuencia de ello pasaría a sobresalir de la membrana, permitiendo quizá así la exposición de los fosfolípidos hacia otras membranas (o a la interfase). Podría incluso proponerse la posibilidad de que exista un **acoplamiento entre oligómeros** de distintas membranas (o entre las membranas y la monocapa interfacial), de manera que se facilitara el movimiento de los lípidos entre las diferentes estructuras.

Por otro lado el modelo predice la existencia de otra zona de interacción del dímero no covalente para el caso de la conformación cerrada del complejo. Al producirse la captura de fosfolípidos en las cavidades hidrofóbicas se produciría un cambio conformacional que tendría como consecuencia la aparición de interacciones entre los monómeros del dímero a través de la parte superior de éste, además de las interacciones existentes a través de las hélices 1. Sería por tanto una característica de la estructura la existencia de una cierta flexibilidad para permitir la apertura y cierre de la cavidad, tal y como ocurre en la saposina B, o en otras proteínas implicadas en la extracción o transporte de lípidos de membrana (Roderick et al., 2002; Schouten et al., 2002).



**Figura 44.** Esquema de un hexámero de dímeros de SP-B insertado en la membrana. Cada subunidad del dímero no covalente se muestra en un color, y en verde se señalan los puentes disulfuro intermoleculares. Al captar un lípido en cada una de las cavidades hidrofóbicas de los dímeros, se produciría un cambio conformacional que cerraría la estructura y haría sobresalir el complejo por encima de la membrana, facilitando así la transferencia de los lípidos entre diferentes estructuras.

***El modelo de la SP-B es coherente con las características estructurales y funcionales de la proteína***

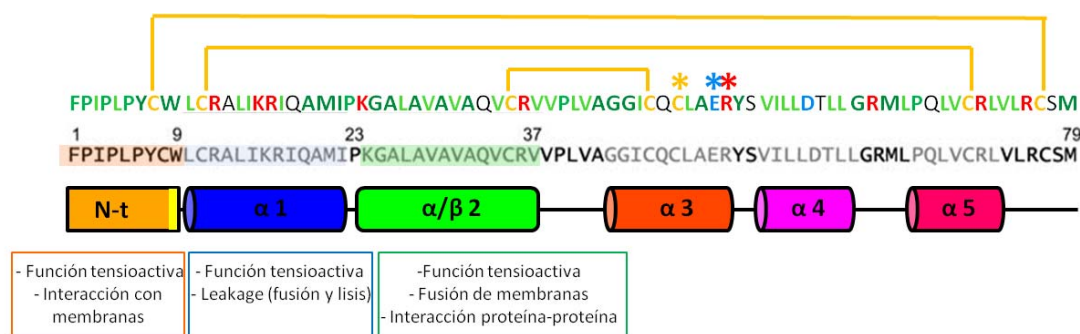
Además de explicar la existencia de sus diversas formas oligoméricas, el modelo generado para la SP-B proporciona una nueva perspectiva a la hora de considerar la importancia funcional de la proteína, pues predice la existencia de un complejo especializado en **optimizar un transporte rápido de los fosfolípidos del surfactante**. Esta organización supramolecular de la SP-B soportaría también lo que se ha venido en llamar las propiedades **fusogénicas** de la proteína, implicadas tanto en el empaquetamiento de las membranas en los cuerpos lamelares (Nogee, 1998) como en la adsorción del material a la interfase durante la inspiración, bien desde la subfase acuosa o desde el reservorio lipídico (Lipp et al., 1996; Perez-Gil y Keough, 1998).

Además, la formación de la estructura predicha por el modelo explicaría las propiedades **membranolíticas** de la SP-B, es decir, la rotura de las vesículas lipídicas y su consecuente pérdida de contenidos (*leakage*) observadas en presencia de la proteína (Poulain et al., 1992). La capacidad de lisis de membranas promovida por la SP-B podría ser importante para permitir la entrada de las enzimas necesarias para el procesamiento de la proSP-C en los cuerpos multivesiculares, así como para la formación y reorganización de la película interfacial en conjunción con las funciones fusogénicas de la proteína (Ryan et al., 2005). La formación de un complejo supradimérico de SP-B en forma de anillo insertado en las estructuras lipídicas del surfactante supondría que la función membranolítica de la proteína no consiste meramente en una perturbación de las membranas, sino en la posible formación de verdaderos poros a través de una estructura especializada y optimizada para el transporte de lípidos.

Este modelo da también sentido a la alta **conservación de la secuencia** de la SP-B, ampliamente documentada, entre las diversas especies animales (figura 23D en el

apartado de Introducción), pues sugiere un requerimiento de la mayor parte de la estructura de la proteína para llevar a cabo sus funciones. Esta necesidad de una estructura primaria tan definida sería consecuencia de la importancia de la oligomerización supramolecular predicha por el modelo, esencial para permitir su máxima capacidad funcional. La conservación de la estructura al completo contrasta no obstante con el hecho de que ciertos péptidos parciales de la secuencia sean capaces de mimetizar algunas de las actividades de la proteína, como los péptidos SP-B<sub>1-25</sub> y SP-B<sub>1-37</sub> (Lipp et al., 1996; Ryan et al., 2005). Aunque dichos péptidos poseen la capacidad de producir fusión y lisis de membranas y de favorecer la adsorción del surfactante, se requiere una concentración mucho mayor (20 veces mayor en el caso de la fusión y 8 veces en el caso de la capacidad membranolítica) que la necesaria para conseguir actividades similares en los ensayos con SP-B nativa.

Por otro lado, el modelo propuesto es compatible con la actividad asignada a cada uno de los fragmentos de la proteína. En la figura 45 se muestra la secuencia de la SP-B humana en la que se señala la naturaleza de sus residuos, y se resaltan sus diferentes dominios (según la organización en forma de 5  $\alpha$ -hélices de Zaltash) (Zaltash et al., 2000), según parecen implicados en cada una de las 3 principales capacidades funcionales de la proteína (fusión y lisis de membranas y capacidad tensioactiva), según experimentos realizados con péptidos sintéticos parciales (Ryan et al., 2005). La importancia del segmento N-terminal para disminuir la tensión superficial a valores mínimos está relacionada con su capacidad para interaccionar con las membranas, de manera que esta secuencia es imprescindible para anclar la proteína a la película interfacial durante las altas presiones a las que ésta es sometida durante la espiración (Kurutz y Lee, 2002; Serrano et al., 2005). La alta actividad de esta región de la SP-B por la interacción con membranas sería responsabilidad principalmente del triptófano 9, pero también del segmento de los primeros 7 aminoácidos, que se ha propuesto que actúa como una secuencia de inserción en membranas (Wang et al., 2003). La hélice 1 es también necesaria para la función tensioactiva de la proteína y para las capacidades de fusión y lisis de membranas, constituyendo también una zona de interacción con la membrana a través de interacciones electrostáticas. El modelo propuesto ilustra cómo el segmento N-terminal y la hélice 1 son realmente los motivos estructurales mediante los cuales la SP-B accede al interior de las membranas y puede capturar los fosfolípidos. La *hélice* 2 (probablemente en forma de lámina beta) parece estar implicada en la disminución de la tensión superficial y la fusión, función esta última que podría ejercer mediante el acercamiento de las membranas a través de interacciones proteína-proteína (Ryan et al., 2005; Ryan et al., 2006). El modelo propone que las interacciones proteína/proteína promovidas por este segmento serían una parte esencial de las interacciones dímero/dímero que soportan el oligómero de SP-B.

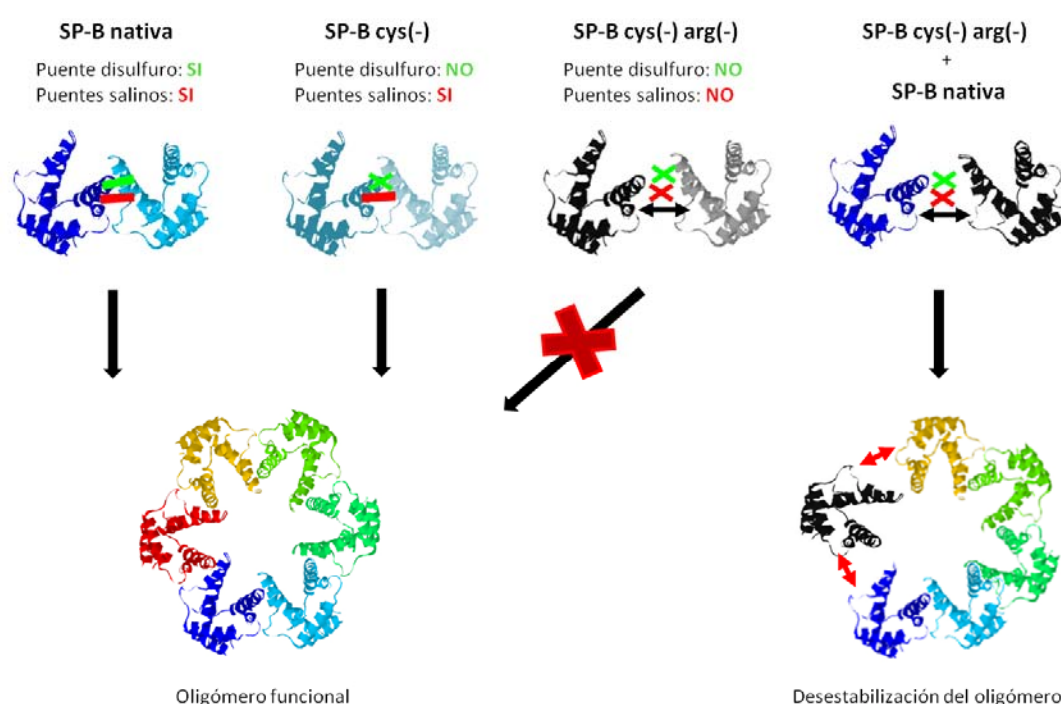


**Figura 45.** Asignación de las principales funciones de la SP-B a los correspondientes fragmentos de su estructura, según los experimentos realizados con péptidos sintéticos diseñados a partir de los distintos segmentos de la proteína (Ryan et al., 2005). En la secuencia superior se muestra en un código de colores la naturaleza de los aminoácidos en cada zona de la proteína: residuos hidrofóbicos en verde, residuos cargados positivamente en rojo y en azul los cargados negativamente. En amarillo se muestran las cisteínas y las líneas indican la formación de los puentes disulfuro intracatenarios. Los asteriscos muestran la zona de oligomerización entre dímeros covalentes: el puente disulfuro intermolecular en amarillo (cisteína 48) y los puentes salinos en azul (glutámico 51) y en rojo (arginina 52).

Como puede observarse por tanto, **las capacidades asignadas a cada segmento de la proteína son coherentes con las interacciones de la SP-B propuestas por el modelo de oligomerización**. De esta manera la interacción de la proteína con la membrana se realizaría a través de los residuos aromáticos del amino terminal tal y como se había estimado anteriormente con el péptido SP-B<sub>1-25</sub> (Gordon et al., 1996; Kurutz y Lee, 2002) y por las interacciones electrostáticas de las hélices 1 (Wang et al., 2003), constituyendo así la base para la función tensioactiva de la proteína al permitir su unión a las membranas y a la monocapa durante la compresión. La asociación de los monómeros de la SP-B producida a través de las hélices 1 sería requerida para la formación del oligómero y por tanto de los poros a través de los cuales tendría lugar la lisis de las membranas, función para la cual es necesario dicho fragmento de la proteína. Por último la importancia de la *hélice 2* en la fusión y su implicación en las interacciones proteína-proteína propuesta por Ryan y colaboradores quedan patentes en el modelo al formar parte dicho fragmento de la interfase de oligomerización entre los dímeros de SP-B, junto con los puentes salinos y el puente disulfuro intermolecular.

Así mismo el modelo es coherente con las evidencias existentes que indican que **el puente disulfuro intercatenario formado por las cisteínas 48 es prescindible** para la funcionalidad de la proteína (Beck et al., 2000a; Ikegami et al., 2002). No obstante la mayor concentración de proteína requerida para una normal actividad en ausencia de estas cisteínas sugiere que existen interacciones no covalentes que dan lugar a la dimerización (Zaltash et al., 2001; Serrano et al., 2005), tal y como predice el modelo a través de los **puentes salinos** generados entre los glutámicos 51 y las argininas 52. Del mismo modo, experimentos realizados con ratones *knock out* de SP-B con el transgen de la proteína con la cisteína 48 sustituida, mostraron que dicha mutación no es letal,

pero sí lo es la doble mutación de la cisteína y de los residuos del puente salino, que fueron sustituidos por aminoácidos que convierten la interacción en repulsiva. Además, la introducción del transgen del doble mutante en ratones normales, es decir, que expresan también la SP-B nativa, es también letal (comunicación personal del Dr. Timothy Weaver). Este resultado, que a simple vista puede parecer sorprendente, puede explicarse considerando el oligómero de SP-B propuesto por el modelo. Los monómeros de proteína con interacciones desestabilizantes, generadas por la mutación en los residuos del puente salino, no sólo no podrían dimerizar con otros monómeros, sino que además impedirían la formación del complejo por parte de los monómeros nativos, ya que una sola subunidad mutada en el oligómero bastaría para desestabilizar toda la estructura (figura 46).



**Figura 46.** Posible efecto de la mutación del puente disulfuro intercatenario y de los residuos del puente salino en la formación del complejo de SP-B, según la función remanente de la proteína como consecuencia de la alteración en la interfase de oligomerización.

El modelo de un complejo oligomérico de la SP-B insertado en la membrana podría explicar la existencia de datos aparentemente contradictorios en la literatura con respecto al tipo de **interacción de la SP-B con las membranas**. Experimentos de fluorescencia y espectroscopía ESR en los que se estudiaron las distancias del triptófano de la proteína al centro de la bicapa y la perturbación de las cadenas de acilo de los lípidos, revelaron un diferente grado de inserción en función de la forma de preparación de los complejos lipoproteicos. Cuando se añadió la SP-B a vesículas de lípido

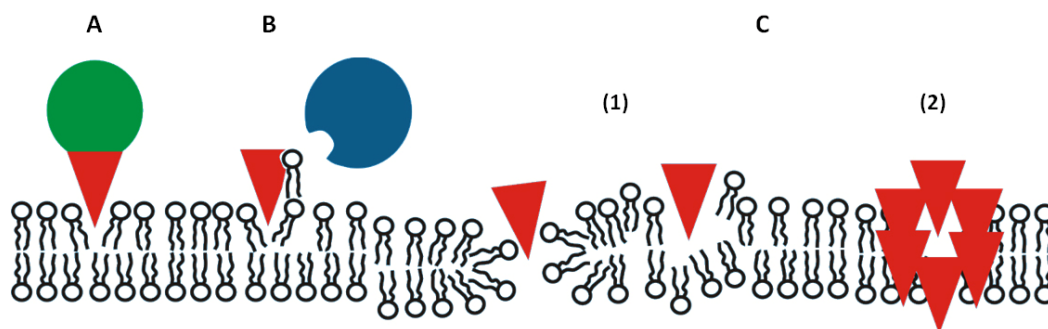
preformadas la proteína mostró una localización periférica en la membrana, mientras que la reconstitución de ambos componentes juntos dio lugar a una localización de la proteína más profunda (Cruz et al., 1998). Esta diferencia podría deberse a que la reconstitución directa de la proteína junto con los lípidos podría fomentar la formación y estabilización de los oligómeros por asociación espontánea de los dímeros, insertándose el complejo en la membrana más profundamente que los dímeros añadidos a vesículas de lípido ya formadas. Además, los distintos grados de asociación de la SP-B a los lípidos encontrados en la literatura podrían suponer una consecuencia de la distinta interacción del oligómero con la membrana en función del cambio conformacional provocado por la captura de fosfolípidos.

Finalmente cabe preguntarse por la estequiometría más probable del oligómero de SP-B, dado que el modelo otorga una probabilidad similar de existencia a la asociación de 5 ó 6 dímeros de proteína. A falta de evidencias directas que permitan corroborar la naturaleza supradimérica de la SP-B, puede especularse que la existencia de un oligómero formado por 6 dímeros podría potenciar las interacciones de dicho complejo de SP-B con la SP-A, cuya estructura está también compuesta por 6 trómeros de proteína. El requerimiento de ambas proteínas para la formación de la mielina tubular podría suponer la existencia de una interacción específica entre ellas para estabilizar la estructura (Perez-Gil, 2008) y una interacción directa SP-A/SP-B ha sido propuesta en varias ocasiones (Taneva y Keough, 2000). Recientemente han surgido además otras evidencias experimentales que apoyan la existencia de una interacción mediada por lípidos entre ambas proteínas, según experimentos realizados mediante NMR (Sarker et al., 2011).

#### ***Mecanismo de acción general de las proteínas de la familia tipo saposina basado en la interpretación del modelo estructural de la SP-B***

La familia de proteínas tipo saposina o SAPLIP está formada por más de 230 miembros que, a pesar de contener secuencias bastante diversas, han conservado una serie de características estructurales a lo largo de la filogenia, desde protozoos a mamíferos. Estas características incluyen la distribución de aminoácidos hidrofóbicos que constituyen el núcleo de la proteína, 6 cisteínas formando 3 puentes disulfuro intramoleculares que les confiere una gran estabilidad (a excepción de la granulisina que sólo contiene 2 puentes disulfuro), y una estructura secundaria en forma de 4 o 5  $\alpha$ -hélices principalmente anfipáticas. Sin embargo, este patrón estructural común parece ser útil para llevar a cabo funciones aparentemente muy diversas, aunque todas comparten como característica principal una capacidad común de unión a lípidos, ya sea permeabilizando membranas para matar células (proteínas de defensa como la granulisina, la NK-lisina o el amebaporo) o simplemente perturbándolas para extraer o transportar lípidos (como las saposinas A-D o la SP-B) (Munford et al., 1995; Bruhn, 2005) (figura 47).





**Figura 47.** Representación esquemática de las principales actividades desarrolladas por las proteínas de la familia tipo saposina. **A.** Unión a la membrana por el dominio SAPLIP (triángulo rojo) dando lugar a un desordenamiento local. **B.** Presentación de lípidos como sustrato a enzimas (círculo azul) mediante su extracción de la membrana. **C.** Permeabilización de la membrana mediante perturbación por monómeros (1) o por formación de poros oligoméricos (2) (Bruhn, 2005).

Un estudio más detallado de las proteínas de la familia cuya estructura tridimensional ha sido resuelta hasta el momento muestra que el empaquetamiento de las hélices tiene lugar como consecuencia de la formación de los puentes disulfuro intramoleculares, generando una estructura terciaria globular, con las hélices agrupadas en dos planos, en la que los puentes disulfuro conectan las diversas hélices dentro de cada hoja, pero no los planos entre sí. Este plegamiento ocurre de manera compacta en ciertos miembros de la familia, como la granulisina, la NK-lisina y la saposina C, y de forma más abierta en otras proteínas como es el caso de la saposina B (Bruhn, 2005).

En cuanto a la estructura cuaternaria, existen proteínas de la familia SAPLIP que dimerizan para llevar a cabo su función, como la saposina B, el amebaporo o la SP-B, siendo ésta última la única en la que se han encontrado dímeros covalentes. En el caso de la saposina B el dímero consiste en una especie de pinza cuya flexibilidad en uno de sus extremos permite la captura de lípidos en su cavidad hidrofóbica (Ahn et al., 2003). El amebaporo A por otro lado posee una superficie hidrofóbica que permite su inserción en la membrana, y como consecuencia de la interacción con los lípidos parece producirse una oligomerización de los dímeros cuyo resultado es la formación de un poro tapizado por residuos polares y con características de canal (Leippe et al., 2005). Dado que otras proteínas permeabilizadoras de membranas, como la NK-lisina y la granulisina, parecen desarrollar su función en un estado monomérico y carecen de zonas hidrofóbicas en la superficie que puedan entrar en la membrana, se ha postulado que su efecto podría estar llevado a cabo por electroporación molecular, es decir, mediante inducción de un campo eléctrico por las cargas positivas de la proteína, lo suficientemente fuerte como para perturbar el empaquetamiento lipídico (Miteva et al., 1999). Basándose en la estructura tridimensional de la granulisina obtenida por cristalización, Anderson llegó a la conclusión de que el proceso de electroporación molecular podría producirse debido a un movimiento de los dos planos de hélices de la proteína en forma de tijera, que sería dirigido por las cargas positivas de la superficie de

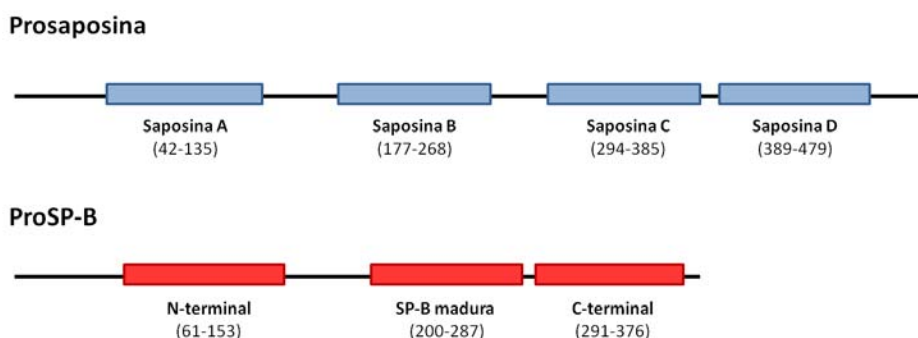
la proteína. Según esto, el contacto inicial se produciría a través de los residuos cargados positivamente y las cargas negativas de la membrana, produciéndose además un giro de los planos que acercaría las zonas líticas de la proteína a la membrana, entre ellas el triptófano 41 de la hélice 3, que se insertaría en la membrana comenzando así la perturbación de ésta. Además, el movimiento de los dominios estaría favorecido por la presencia de cavidades hidrofóbicas pequeñas en la proteína (que no son suficientemente grandes para la inserción de un lípido) existentes en la granulisinina y también en otras proteínas como la NK-lisina y el amebaporo. Independientemente del mecanismo utilizado para interaccionar con la membrana y llevar a cabo su lisis, Anderson propuso además que, una vez en la superficie de la membrana, la granulisinina podría oligomerizar a través de puentes salinos (Asp3-Arg38' y Lys13-Asp71') formando un clúster de moléculas que permitiría una lisis cooperativa, de manera similar a lo que ocurre en otros péptidos líticos que dan lugar a la formación de poros (Anderson et al., 2003). Finalmente cabe destacar en cuanto al mecanismo de acción de la NK-lisina, que experimentos realizados con membranas planas formadas por diferentes especies lipídicas revelaron que esta proteína sí es capaz de formar poros bien definidos en las membranas, siendo éstos específicos para ciertos tipos de lípidos (Gutsmann et al., 2003).

Todo lo expuesto lleva a la conclusión de que no se conoce con claridad cómo las diferentes proteínas de esta familia llevan a cabo su actividad perturbadora de membranas, careciéndose hasta el momento de un mecanismo común de funcionamiento cuya existencia podría considerarse probable considerando las similitudes estructurales y funcionales entre ellas. Por otra parte, y a pesar de que la actividad membranolítica de las proteínas granulisinina y NK-lisina pueda ser desarrollada por las proteínas en forma monomérica, los datos arriba mencionados sugieren que el mecanismo de acción de estas proteínas podría resultar más complejo, con la posibilidad de la existencia de etapas de oligomerización de las moléculas de proteína como consecuencia de la interacción con las membranas. La existencia de los dímeros de saposina B como unidad funcional optimizada para la extracción y transporte de los lípidos y la compleja organización supramolecular descrita para el amebaporo A, podrían apuntar también a un mecanismo de acción más general de lo pensado hasta el momento, que podría estar basado en la oligomerización de las proteínas para desarrollar sus actividades membranolíticas.

Cabría por lo tanto pensar que el modelo propuesto para la estructura oligomérica de la SP-B, obtenido a partir de la estructura de la saposina B, podría no estar lejos del mecanismo de acción del resto de las proteínas de la familia. La SP-B es la única proteína de la familia que no es soluble en agua y cuya asociación con los lípidos es permanente y no transitoria. Podría ocurrir que las estructuras que se han propuesto hasta ahora para el resto de proteínas de la familia se tratasen tan sólo de las formas solubles. En el caso de la SP-B, la saposina B y el amebaporo, se ha reconocido una unidad funcional dimérica, a diferencia de las demás proteínas que se han descrito siempre en forma monomérica. En cualquier caso, y como consecuencia de la unión de

las proteínas a la membrana, éstas podrían adoptar una organización oligomérica, generándose un complejo proteico que habría sido evolutivamente optimizado para la extracción o el transporte de lípidos, y cuya consecuencia final sería, en función de la proteína en concreto, la presentación de los esfingolípidos a las enzimas correspondientes (saposinas), el empaquetamiento de las membranas del surfactante y el movimiento eficaz de los fosfolípidos a través de ellas (SP-B), o la lisis de las membranas celulares (amebaporos, NK-lisina, granulisina).

La existencia de un precursor tan complejo como el de la SP-B (381 aminoácidos) para generar finalmente un péptido de tan sólo 79 aminoácidos, ha llamado siempre la atención por el gran gasto energético que supone la síntesis de una proteína tan grande cuya única función aparente consiste en dar lugar a la SP-B madura (Weaver y Whitsett, 1991; Zaltash y Johansson, 1998). El precursor de la SP-B presenta homología de secuencia con la prosaposina, precursor de las saposinas A-D, que además de dar lugar a estas proteínas parece tener por sí mismo un papel en el transporte de gangliósidos (Kishimoto et al., 1992). El precursor de la SP-B contiene tres repeticiones en tándem de en torno a 90 residuos que constituyen dominios tipo saposina (figura 48) (O'Brien y Kishimoto, 1991; Patthy, 1991; Zaltash y Johansson, 1998) que tras su hidrólisis dan lugar a los propéptidos N y C terminal y a la SP-B madura. Además de un papel del péptido N-terminal en el correcto procesamiento de la proSP-B a lo largo de la ruta secretora en los neumocitos (Serrano et al., 2007; Banares-Hidalgo et al., 2008), los propéptidos son secretados al espacio alveolar junto con la SP-B, lo que sugiere que podrían desarrollar algún tipo de función en el pulmón, probablemente relacionada con actividades antimicrobianas (Yang et al., 2009). Considerando la presencia de varios dominios tipo saposina en el precursor, sería también posible la existencia de una organización supramolecular compleja según la predicha por el modelo de SP-B para los propéptidos N y C terminal e incluso para el propio precursor completo, cuya implicación funcional está todavía lejos de aclararse.



**Figura 48.** Dominios tipo saposina del precursor de las saposinas y del precursor de la SP-B.



**ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE COMPLEJOS  
PROTEICOS NATIVOS DEL SURFACTANTE  
PULMONAR PURIFICADOS CON DETERGENTES**



## **5. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE COMPLEJOS PROTEICOS NATIVOS DEL SURFACTANTE PULMONAR PURIFICADOS CON DETERGENTES**

### **5.1. INTRODUCCIÓN**

La potencial estructura oligomérica definida para la SP-B obtenida por modelización a partir de la estructura tridimensional de la saposina B, implica la existencia de estructuras proteicas nativas en el surfactante de mucha mayor complejidad que las asumidas hasta el momento. De hecho, se pueden encontrar numerosas evidencias experimentales en la literatura referentes a la tendencia a la oligomerización de la SP-B así como a la existencia de interacciones entre SP-B y otras proteínas del surfactante (Taneva y Keough, 1994; Wustneck et al., 2003; Cruz et al., 2004; Cabre et al., 2009; Jiménez Cabré, 2009).

Por ello, como objetivo principal de este segundo capítulo se ha planteado la detección y caracterización de complejos nativos en los que participen las proteínas del surfactante, especialmente la SP-B. Los métodos tradicionales de purificación de las proteínas hidrofóbicas del surfactante requieren el empleo de disolventes orgánicos, por lo que la reconstitución de las proteínas en sistemas lipoproteicos incluye el secado del disolvente a partir de mezclas de lípidos y proteínas en solución orgánica, y la rehidratación en medio acuoso. Esto puede forzar que muchas de las regiones hidrofóbicas de las proteínas pasen a formar interacciones con los lípidos, alterando así posibles interacciones proteína-proteína entre algunas de esas zonas que podrían formar parte del plegamiento nativo de las proteínas. Por ello, el abordaje del análisis de la estructura nativa de los complejos proteicos del surfactante debe partir del desarrollo de un método alternativo de aislamiento que evite la utilización de disolventes orgánicos, como los utilizados tradicionalmente para la obtención de proteínas en detergentes no desnaturizantes, ampliamente utilizados con éxito para preservar la estructura de otras proteínas de membrana (Garavito y Ferguson-Miller, 2001; Prive, 2007).

Para llevar a cabo la obtención de complejos nativos del surfactante, se desarrollaron diferentes estrategias con el fin de detectar la existencia de complejos proteicos supramoleculares nativos en el surfactante pulmonar, y de lograr la purificación de una muestra suficientemente homogénea para su caracterización estructural y funcional. Tras la solubilización del surfactante con 3 detergentes con diferentes propiedades físico-químicas, se procedió a la separación de fracciones del surfactante solubilizado con el detergente zwitteriónico CHAPS, mediante diferentes métodos de purificación que incluyen la centrifugación en gradiente de densidad, una cromatografía de penetrabilidad y una cromatografía de intercambio iónico.

Los complejos proteicos obtenidos mediante cromatografía de intercambio iónico, suficientemente homogéneos y principalmente constituidos por SP-B, fueron caracterizados estructuralmente, y comparados con la SP-B purificada con disolventes

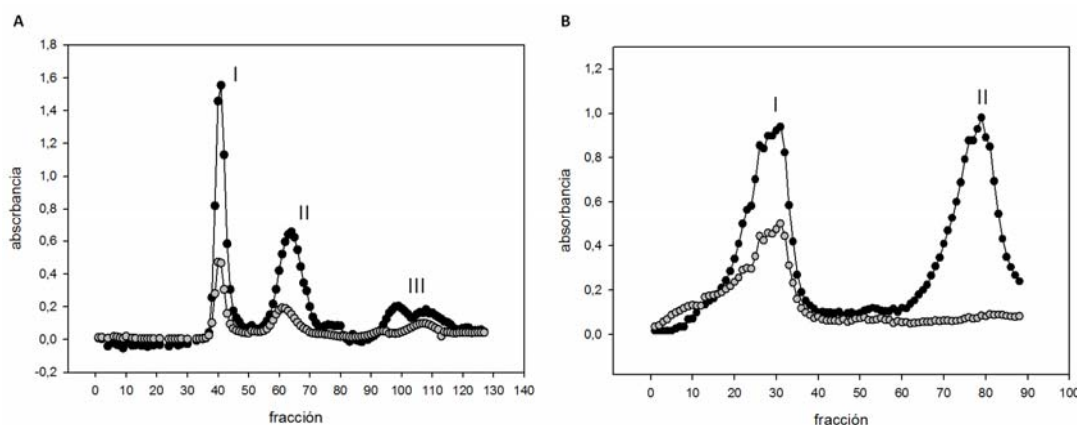
orgánicos, mediante diroísmo circular, emisión de fluorescencia intrínseca, centrifugación analítica, electroforesis nativa y microscopía electrónica. Finalmente fueron también reconstituidos en lípidos y caracterizados funcionalmente mediante el empleo del surfactómetro de burbuja cautiva (CBS).

Los resultados obtenidos en este capítulo referentes a los complejos proteicos constituidos por SP-B, solubilizados, purificados y caracterizados en CHAPS, serán relacionados en la discusión con el modelo de la estructura de la SP-B expuesto en el capítulo anterior, de manera que los datos obtenidos por ambas vías convergen en una hipótesis común que propone una estructura nativa de la SP-B con una organización supramolecular mucho más compleja que la supuesta hasta el momento.

## 5.2. RESULTADOS

### 5.2.1. Solubilización del surfactante pulmonar con detergentes no desnaturalizantes

Tradicionalmente, las proteínas hidrofóbicas del surfactante han sido purificadas mediante cromatografía de penetrabilidad a partir del extracto orgánico en cloroformo/metanol, tal y como se describe en el apartado 3.1.1.3. de materiales y métodos. En esta Tesis se han utilizado proteínas obtenidas de esta forma en disolvente orgánico para su comparación con los complejos proteicos purificados en detergente. En la figura 49A se muestra el perfil de elución de la cromatografía Sephadex LH-20 utilizada para la separación de los componentes del extracto orgánico de surfactante, obteniéndose un primer pico que contiene las proteínas hidrofóbicas, y dos picos más que constituyen la fracción lipídica del surfactante (Perez-Gil et al., 1993), que también ha sido utilizada en este trabajo para la reconstitución de las proteínas hidrofóbicas en vesículas lipídicas.

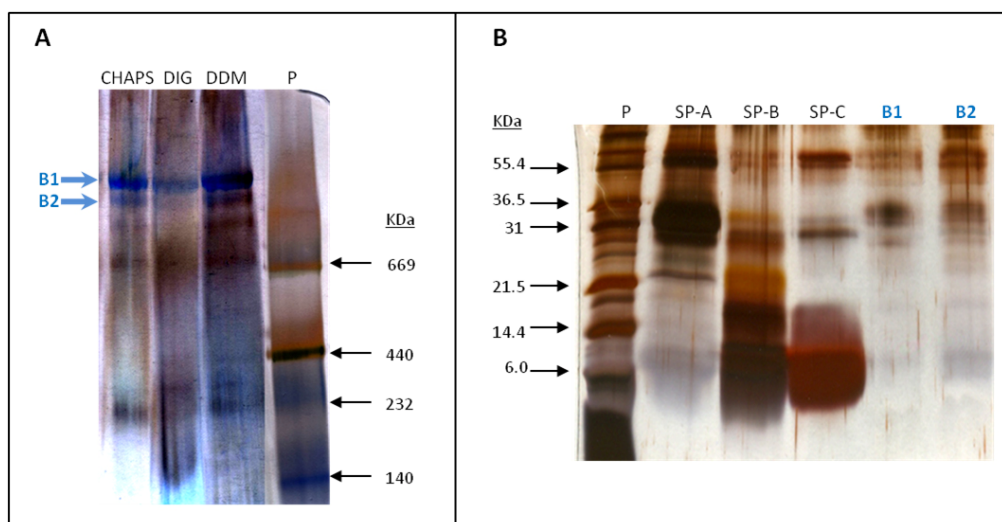


**Figura 49.** Perfiles de elución de las cromatografías en Sephadex LH-20 (A) y LH-60 (B) de un extracto orgánico de surfactante. Los círculos negros representan la absorbancia a 240 nm, mientras que los grises indican absorbancia a 280 nm. Como se muestra en A, la cromatografía del extracto en LH-20 resuelve 3 fracciones, correspondiendo la primera de ellas a las proteínas y las otras dos a los lípidos del surfactante. El pico I de la LH-20 se cargó posteriormente en una segunda cromatografía (B) en la que se separaron la SP-B (I) y SP-C (II).



El perfil de elución de la figura **49B** es el resultado de la cromatografía en Sephadex LH-60 de la fracción I obtenida anteriormente, y que corresponde a un primer pico de SP-B, que eluye primero debido a su mayor tamaño, y un segundo pico de SP-C, de menor tamaño y sin adsorción a 280 nm, debido a la ausencia de residuos aromáticos en esta proteína.

Para la obtención de complejos proteicos del surfactante sin la utilización de disolvente orgánico se procedió a la solubilización del surfactante nativo entero con 3 detergentes no desnaturalizantes: el detergente zwitteriónico CHAPS, y los detergentes no iónicos digitonina y dodecilmaltósido. La fracción solubilizada se cargó en un gel en gradiente de acrilamida y se realizó una electroforesis en condiciones nativas “Blue Native”. Esta electroforesis, desarrollada en presencia del colorante Blue G-250, hace que los diferentes componentes de la muestra migren esencialmente en función de su masa, y no tanto de su carga. La tinción con plata de este gel se muestra en la figura **50A**, en la que se observa la aparición de bandas de muy elevada masa molecular: una o varias bandas en torno a los 230 kDa, una banda aproximadamente a los 670 kDa y 3 bandas por encima de los 1000 kDa. La similitud de este patrón de bandas cuando se comparan las muestras solubilizadas mediante los 3 detergentes utilizados indica la existencia de complejos proteicos de un elevada masa molecular en el surfactante nativo, que no constituyen meros agregados de proteína, sino complejos de tamaño bien definido que se mantienen organizados tras la solubilización de los complejos de surfactante con detergentes no desnaturalizantes con diferentes propiedades físico-químicas.

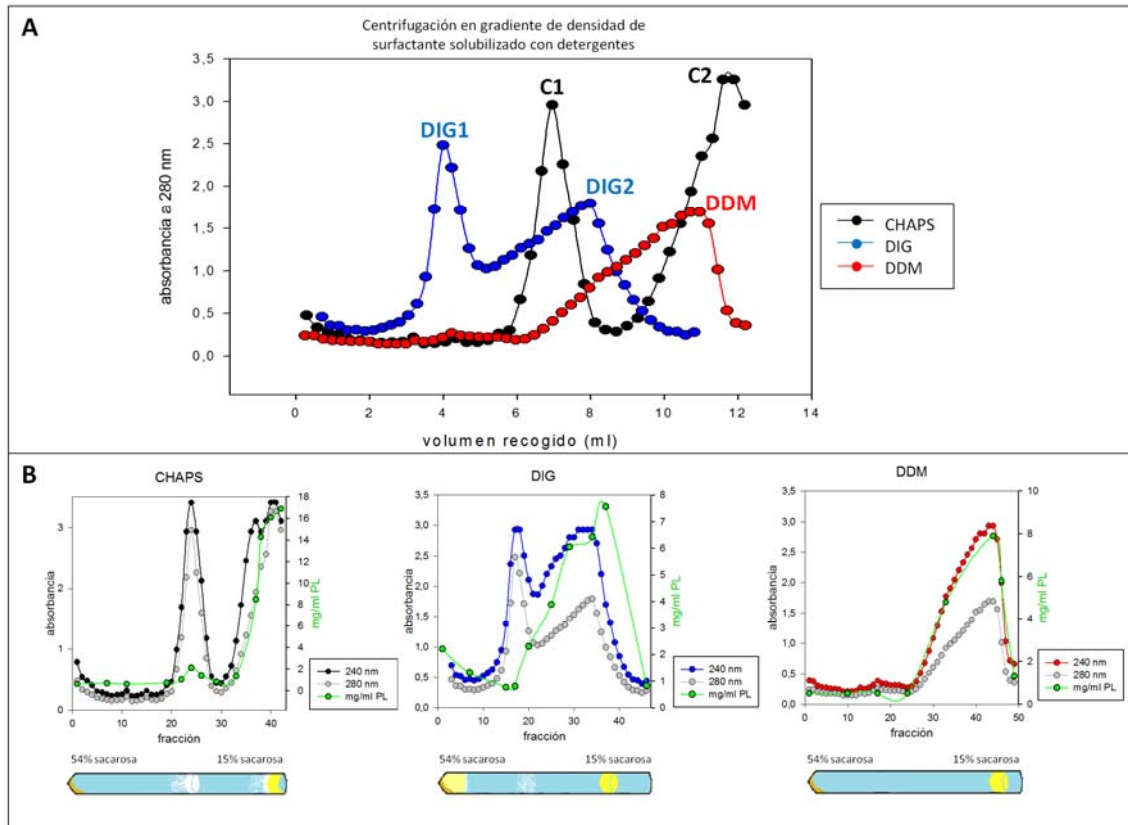


**Figura 50.** En **A** se muestra un gel en gradiente de 3-13% de acrilamida, en el que se cargó surfactante solubilizado con CHAPS, digitonina (DIG) o dodecilmaltósido (DDM). En **P** se cargó un patrón de masas moleculares conocidas, indicadas a la derecha. La electroforesis se desarrolló en condiciones nativas (“blue native”), y el gel se tiñó con plata. Las bandas B1 y B2 se cortaron y se cargaron en un gel (**B**) en condiciones desnaturalizantes y reductoras.

Para obtener más información sobre la naturaleza de los complejos de mayor masa molecular, las dos bandas superiores (B1 y B2) fueron sometidas a una segunda dimensión consistente en una electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS) y reductoras, cuyo resultado se muestra en la tinción con plata de la figura **50B**. En ella se intuye una composición multiproteica de dichos complejos, que según el patrón de bandas de las muestras B1 y B2 estarían constituidos por SP-A (en torno a 36 kDa y bandas superiores) pero también por proteínas de menor tamaño que corresponderían a SP-B y SP-C, como se observa especialmente en la muestra B2 por la aparición de una banda de entre 6-8 kDa. Cabe mencionar que aunque en el control de SP-A que aparece en el gel se observa también una banda de menor tamaño, ésta no es debida a la SP-A (cuyo monómero tiene un peso molecular mínimo de 28 kDa), sino a contaminación por SP-B durante el aislamiento de la proteína, tal y como se observó mediante *Western blot* de dicho control.

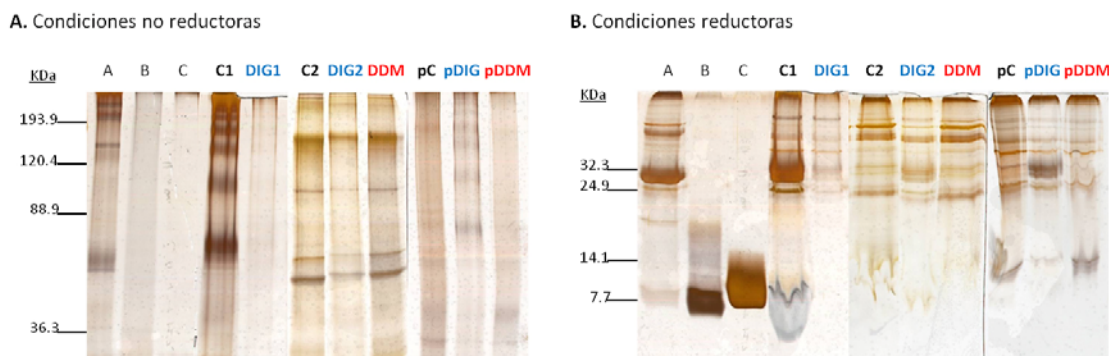
### **5.2.2. Separación mediante centrifugación en gradiente de densidad de diferentes fracciones del surfactante solubilizado con detergentes**

La existencia de complejos formados por varias de las proteínas del surfactante tras su solubilización con detergentes, sugirió que podría ser interesante el estudio de complejos tras su separación mediante centrifugación en gradiente de densidad. Como se observa en la figura **51A**, el comportamiento de los complejos en el gradiente de sacarosa fue diferente en función del detergente utilizado para solubilizar el surfactante, distinguiéndose dos picos bien resueltos de proteína en el caso de la solubilización con CHAPS, dos picos solapantes en la solubilización con digitonina, y sólo uno en el tratamiento con dodecilmaltósido, que parece solubilizar peor el surfactante. El pico de proteína obtenida con este último detergente y el segundo pico obtenido tanto en la solubilización con CHAPS como con digitonina, se encuentran asociados a los lípidos del surfactante, tal y como indica su flotabilidad en el gradiente de densidad y la valoración de fosfolípido en estas fracciones (líneas verdes de la figura **51B**). Además de las medidas de absorción, en la figura se representa la apariencia a simple vista de los tubos del gradiente tras la centrifugación, en los que se observa la existencia de un precipitado, además de zonas de color amarillento y blanquecino que concuerdan con las fracciones que contienen lípidos y proteínas respectivamente, según revelan sus perfiles de absorbancia y de contenido en lípido.



**Figura 51.** Centrifugación en gradiente de densidad de surfactante solubilizado con CHAPS, digitonina (DIG) y dodecilmaltósido (DDM). En **B** se muestran los perfiles de absorbancia de las fracciones solubilizadas con cada detergente por separado, así como la concentración de fosfolípido en ellas (eje y derecho). Los dibujos representan la apariencia de los tubos tras la centrifugación, en los que a simple vista se distinguen los diversos picos de proteína y lípido.

Para estudiar la composición proteica de los diferentes picos obtenidos tras la centrifugación del surfactante solubilizado con los 3 detergentes, se realizaron electroforesis en presencia de SDS de las diversas fracciones. Las electroforesis desarrolladas en condiciones no reductoras (figura 52A) mostraron un patrón de bandas similar para los 3 detergentes en el pico de proteína asociada a lípido, es decir, los picos CHAPS2, DIG2 y el único pico de DDM, observándose en ellos bandas definidas de 175, 115, 80 y 65 kDa. Sin embargo, el primer pico obtenido con la solubilización con CHAPS muestra una movilidad electroforética distinta, apareciendo bandas en torno a 195, 183, 170, 120 y 85 kDa. Por otro lado, no se observaron bandas en el pico 1 de la solubilización con digitonina, lo que sugiere que, al igual que en el caso de los controles de SP-B y SP-C obtenidas de disolvente orgánico, y debido al porcentaje de acrilamida utilizado, las proteínas con menor masa molecular han salido del gel. En cuanto al control de SP-A se observaron bandas de 195, 170 y 80 kDa, correspondientes al trímero de esta proteína y a formas con mayor grado de oligomerización. Aunque la mayoría de las bandas encontradas en los complejos en detergente puedan por tanto asignarse a la SP-A, la banda en torno a 120 kDa en el pico CHAPS 1 y en los picos CHAPS2, DIG2 y DDM, así como la banda de 65 kDa de estos últimos picos, sugieren la existencia de otra proteína en estos complejos.

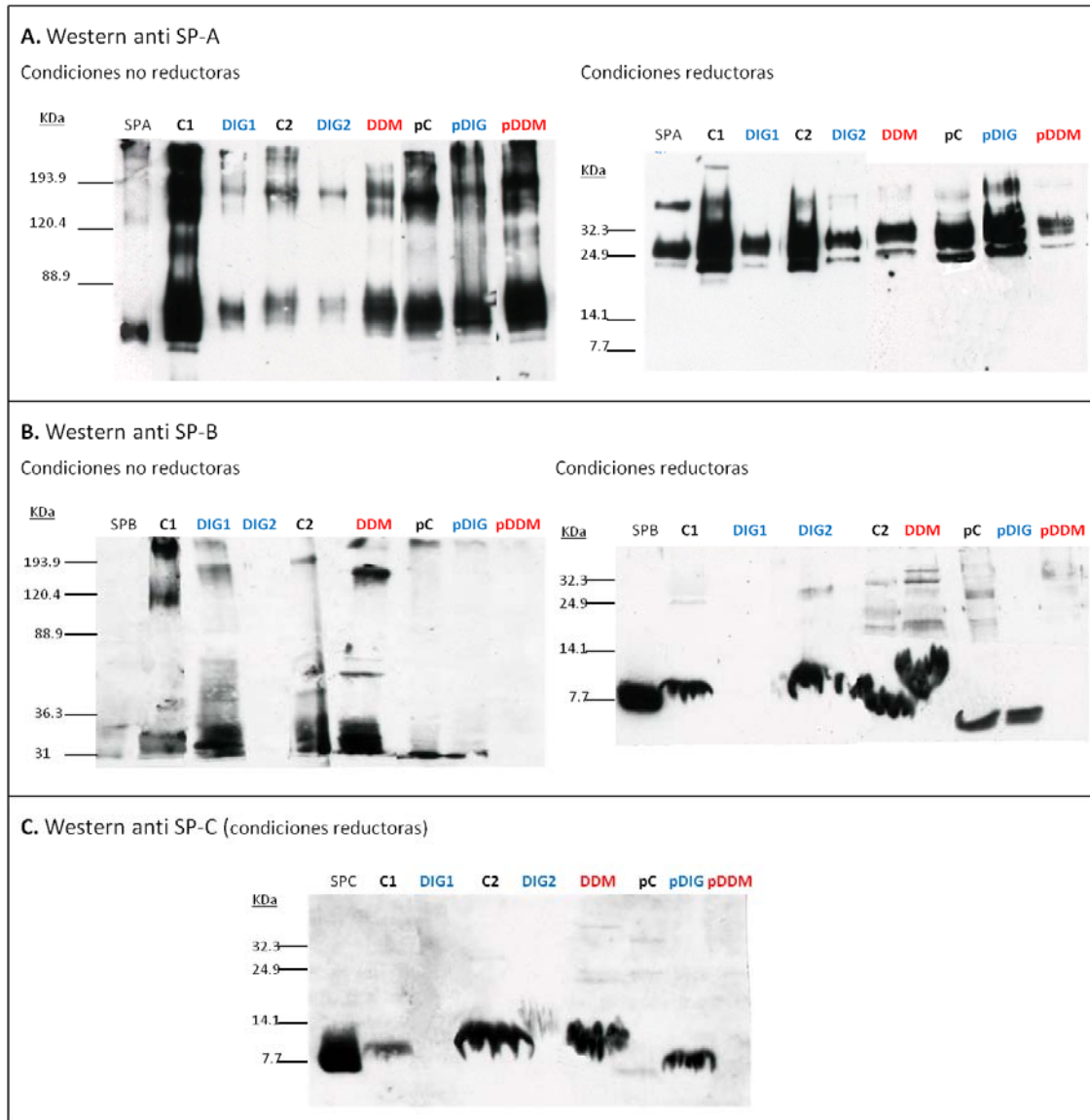


**Figura 52.** Análisis electroforético de las fracciones obtenidas mediante centrifugación en gradiente de densidad de surfactante solubilizado con detergentes. Los carriles A, B, C se refieren a las proteínas de surfactante SP-A, SP-B y SP-C purificadas por métodos tradicionales. C1, C2, DIG1, DIG2 y DDM corresponden a los picos principales de los perfiles representados en la figura 51. pC, pDIG y pDDM son los precipitados obtenidos tras la centrifugación en gradiente. En **A** aparecen las proteínas en condiciones no reductoras, en geles al 8% de acrilamida, mientras que en **B** se muestran las proteínas reducidas con  $\beta$ -mercaptoetanol, en geles al 16% de acrilamida. En ambos casos las electroforesis se desarrollaron en presencia de SDS y los geles fueron teñidos con plata.

El análisis electroforético de las fracciones en condiciones reductoras (figura **52B**) mostró de nuevo un patrón de bandas similar para los picos de proteína asociada a lípido, indicando una composición semejante de los complejos purificados con los diferentes detergentes. En ellos, al igual que en el primer pico de la solubilización con CHAPS, se observa la existencia de bandas de baja masa molecular, en torno a las movibilidades electroforéticas de los monómeros de SP-B y SP-C en los controles purificados en disolvente orgánico, confirmando la presencia de alguna o ambas proteínas en los complejos de elevada masa molecular observados en condiciones no reductoras. Nótese la dificultad del análisis electroforético de los componentes de baja masa molecular en las muestras en las que aparece un contenido importante de lípidos.

Para estudiar la presencia de las proteínas del surfactante en cada una de las bandas observadas, se llevaron a cabo *Western blots* para SP-A, SP-B y SP-C. Tal y como se observa en la figura **53A**, todas las fracciones estudiadas, tanto de los picos 1 como de los picos 2, contienen SP-A, que aparece en las bandas de 195 y 80 kDa en condiciones no reductoras, y a 28 kDa en condiciones reductoras, correspondiente al monómero. En cuanto a la presencia de SP-B, también se encontró en todas las fracciones en condiciones reductoras (figura **53B**), a excepción del primer pico de la solubilización con digitonina. La SP-B reducida aparece en las muestras de forma monomérica, al igual que en el control de SP-B purificada en disolvente orgánico, y también en formas oligoméricas que podrían corresponder a dímeros y trímeros, principalmente en las fracciones de proteína asociada a lípido. En condiciones no reductoras sin embargo, existe una gran parte de SP-B en formas supradiméricas, apareciendo en todas las fracciones salvo en DIG2 una banda ancha de entre 30-36 kDa, que podría estar formada por trímeros y tetrámeros, así como una banda de elevada

masa molecular en torno a los 175 kDa en C2 y DDM, una banda de aproximadamente 120 kDa en C1 y una de en torno a 65 kDa en C2 y DDM. Por último, los *Westerns* anti SP-C revelaron una ausencia total de bandas de alta masa molecular en condiciones no reductoras (resultados no mostrados) y la aparición de SP-C monomérica en condiciones reductoras (figura 53C) en todas las fracciones ensayadas (salvo DIG1), sin encontrarse evidencias de oligómeros de esta proteína, a excepción de unas tenues bandas en DDM.



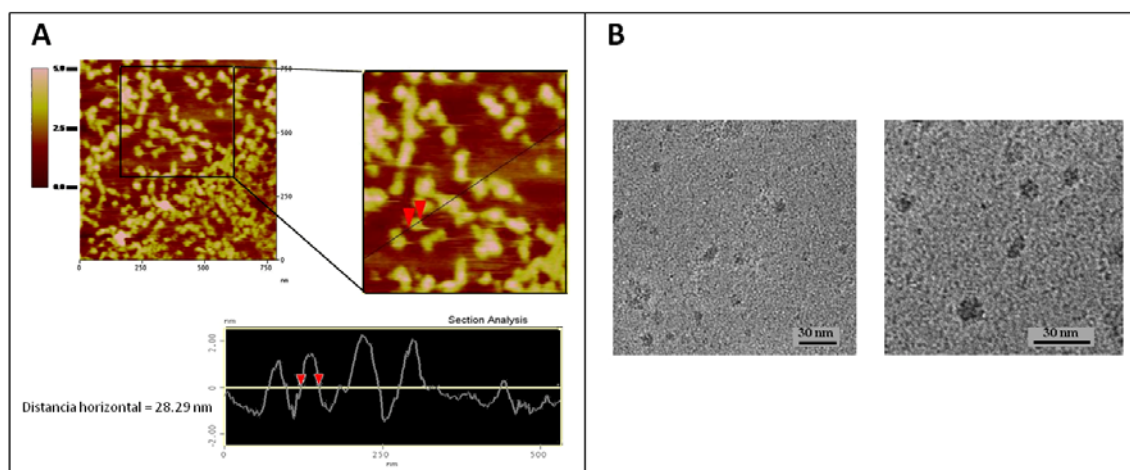
**Figura 53.** *Western blots* de las fracciones obtenidas tras la centrifugación en gradiente de densidad de surfactante solubilizado con detergentes (figura 51). **A.** Anti SP-A. Muestras analizadas en un gel al 8% de acrilamida en condiciones no reductoras, y en un gel al 16% en condiciones reductoras. **B.** Anti SP-B. Muestras analizadas en un gel al 8% de acrilamida en condiciones no reductoras, y en un gel al 16% en condiciones reductoras. **C.** Anti SP-C. Muestras analizadas en un gel al 16% de acrilamida en condiciones reductoras.



En resumen, los complejos proteicos de elevada masa molecular encontrados en el surfactante tras su solubilización con detergentes, pueden separarse en dos tipos en función de su densidad y asociación a los lípidos, sin constituir ninguno de los dos una población pura de complejos constituidos por un solo tipo de proteína, sino que estarían todos ellos formados por la asociación de varias proteínas del surfactante.

A partir de estos resultados se eligió la solubilización del surfactante con CHAPS como la principal herramienta para el estudio de estos complejos proteicos, ya que este detergente fue el que permitió una mayor resolución de las dos fracciones de diferente densidad, así como una mayor diferencia en cuanto al comportamiento electroforético de las muestras correspondientes a ambas fracciones. Por ello, el resto de los experimentos descritos en el presente capítulo se desarrollaron mediante el empleo exclusivo de CHAPS.

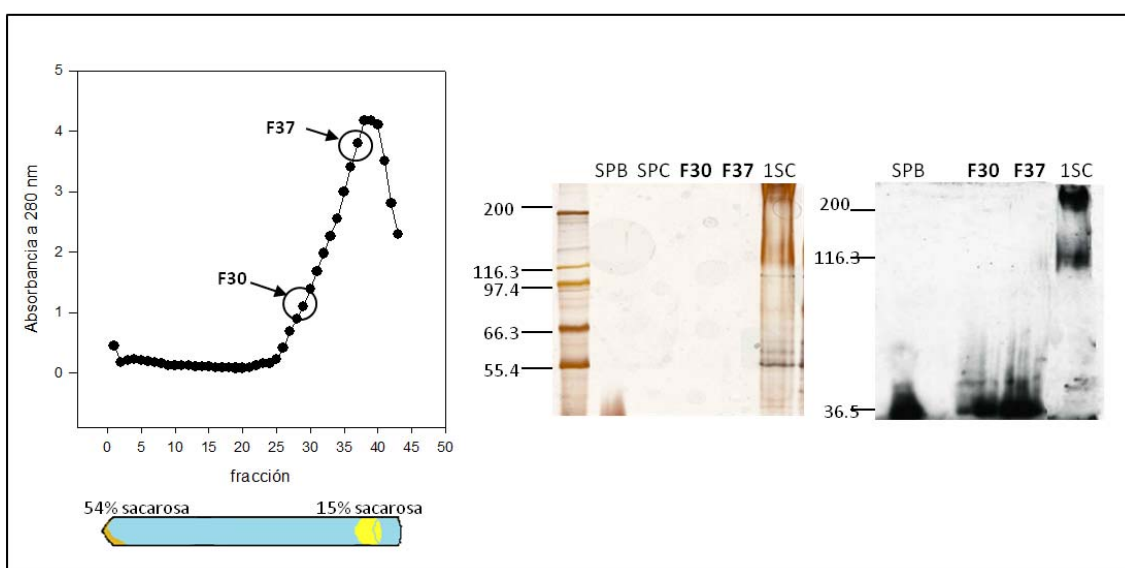
Para realizar un primer análisis de la complejidad estructural de los complejos separados por la centrifugación en gradiente de densidad del surfactante solubilizado con CHAPS, se obtuvieron imágenes de microscopía electrónica y de fuerza atómica. Como se muestra en la figura 54A, las imágenes de AFM de una fracción del pico 1 revelaron la existencia de partículas de forma y tamaño definidos, de aproximadamente 30 nm de diámetro. En las imágenes de microscopía electrónica de transmisión aparecieron también partículas definidas (figura 54B), aunque de tamaño en torno a los 10 nm. Estas diferencias de tamaño podrían ser debidas no obstante a diferencias metodológicas en la aplicación de ambos tipos de microscopía. El tamaño de la punta utilizada para la AFM, por ejemplo, limita la estimación precisa del tamaño de las partículas. A pesar de la existencia de estas partículas, la observación de la muestra por microscopía reveló que no se trata de muestras homogéneas, y por tanto no pudo realizarse un análisis más detallado de la estructura de las partículas presentes en ellas.



**Figura 54.** Análisis microscópico del pico C1 de la centrifugación en gradiente de densidad de surfactante solubilizado con CHAPS. Las imágenes topográficas de microscopía de fuerza atómica de este material tomadas en modo *tapping* (A) reveló la presencia de partículas de forma y tamaño repetitivos, en torno a 30 nm de diámetro aparente. Las imágenes tomadas mediante microscopía electrónica de transmisión (B) mostraron también la existencia de partículas de un tamaño aproximado de 10 nm.

### 5.2.3. Centrifugación en gradiente de densidad de fracciones del surfactante reconstituido y solubilizado con CHAPS

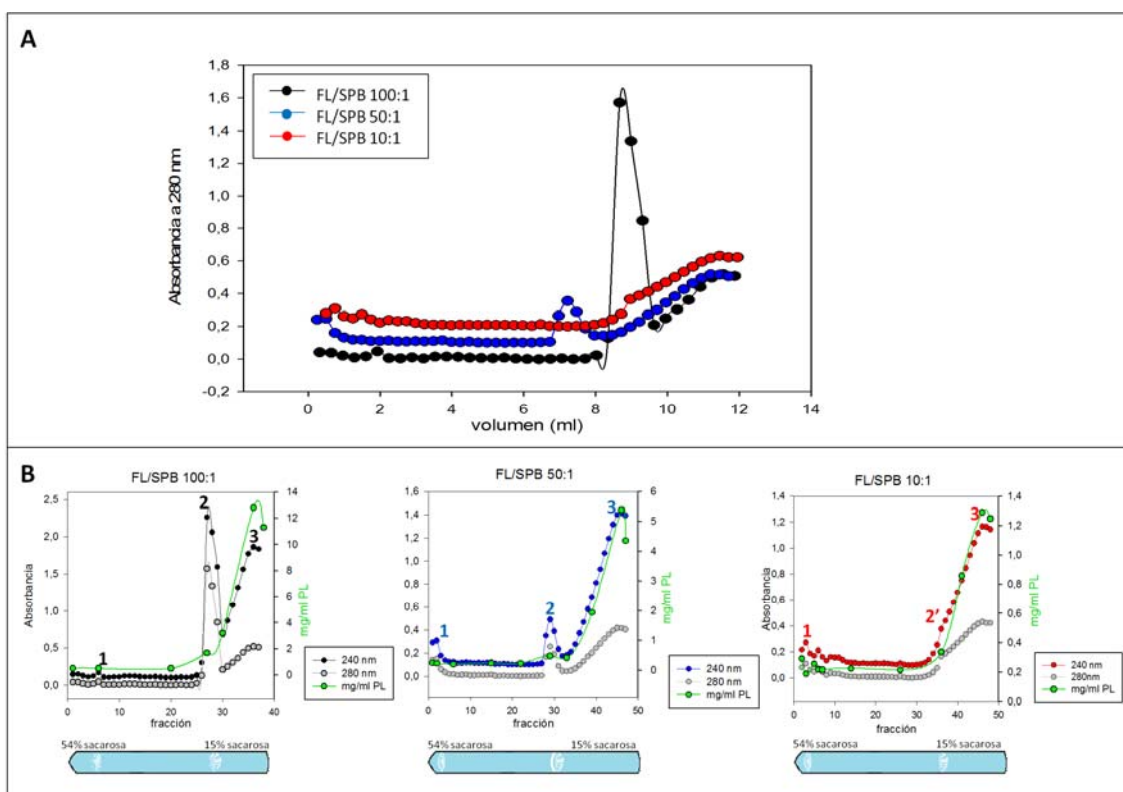
Para estudiar la existencia de los complejos proteicos observados en el surfactante en muestras reconstituidas a partir de los extractos orgánicos y en ausencia de proteínas hidrofílicas, se realizó una centrifugación en gradiente de densidad de extracto orgánico de surfactante secado y rehidratado en medio acuoso y posteriormente solubilizado por CHAPS en las mismas condiciones en las que se había solubilizado el surfactante nativo. El objetivo era ver si alguno de los complejos proteicos observados podría establecerse también en las muestras reconstituidas una vez eliminado el disolvente orgánico. El resultado se muestra en la figura 55, en la que se observa como los lípidos y proteínas hidrofóbicas del surfactante aparecen en estas muestras asociados formando un único pico tras la centrifugación. El análisis electroforético y mediante *Western blot* de diversas fracciones del pico mostró que en condiciones no reductoras la proteína SP-B migra en posiciones equivalentes a las de la proteína purificada en disolvente orgánico, no observándose las bandas de elevado peso molecular (120 kDa) que aparecían en el análisis del surfactante nativo solubilizado por CHAPS. Esto indica la desaparición de estos complejos como consecuencia del tratamiento con disolvente orgánico o de la ausencia de proteínas hidrofílicas.



**Figura 55.** Centrifugación en gradiente de densidad de extracto orgánico rehidratado y solubilizado con CHAPS. Se muestra una tinción con plata y *Western blot* anti SP-B de dos fracciones de la solubilización, en geles al 7.5% de acrilamida y en condiciones no reductoras. En los geles aparece también para su comparación el pico 1 de la centrifugación en gradiente de surfactante solubilizado con CHAPS (1SC).

Por último se prepararon muestras de SP-B purificada en disolvente orgánico reconstituidas en la fracción lipídica de surfactante, y se centrifugaron en el gradiente de densidad tras su solubilización con CHAPS (figura 56). Se utilizaron diferentes proporciones lípido/SP-B, manteniendo siempre constante la concentración final de SP-

B. En el caso de la relación lípido/proteína 100:1, equivalente a la proporción de SP-B estimada en el surfactante, se obtuvieron 2 picos de absorción a 280 nm, observándose que el segundo de ellos, que contiene prácticamente la totalidad de los lípidos de la muestra (ver líneas verdes de concentración de fosfolípido) poseía una baja absorción a 280 nm. Cuando se redujo la relación lípido/proteína a 50:1 se observó una disminución en la absorbancia del pico 2 de proteína y un ligero desplazamiento del mismo a regiones de mayor densidad. Este pico desaparece totalmente cuando la relación lípido/proteína usada para resuspender inicialmente la SP-B fue 10:1, el doble de la mínima necesaria para incorporar la proteína en vesículas lipídicas (Perez-Gil et al., 1993).

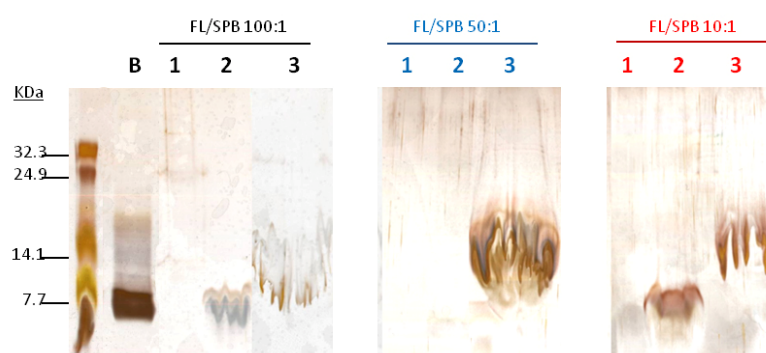


**Figura 56.** Centrifugación en gradiente de densidad de la fracción lipídica del surfactante suplementada con diferentes proporciones peso/peso de SP-B, rehidratada y solubilizada con CHAPS. En todos los casos la cantidad total de SP-B utilizada fue la misma, disminuyéndose la cantidad de fosfolípido para reducir la relación lípido/proteína. En **B** se muestran los perfiles de absorbancia de las fracciones solubilizadas así como la concentración de fosfolípido en ellas. Los números en color de las gráficas en B indican las fracciones que fueron estudiadas mediante electroforesis (figura 57).

El análisis electroforético de las fracciones de la centrifugación en gradiente de estas muestras se muestra en la figura 57. La electroforesis en condiciones no reductoras tuvo como resultado geles en los que no se apreció ninguna banda de elevada masa molecular (geles no mostrados). En condiciones reductoras se confirma la presencia de



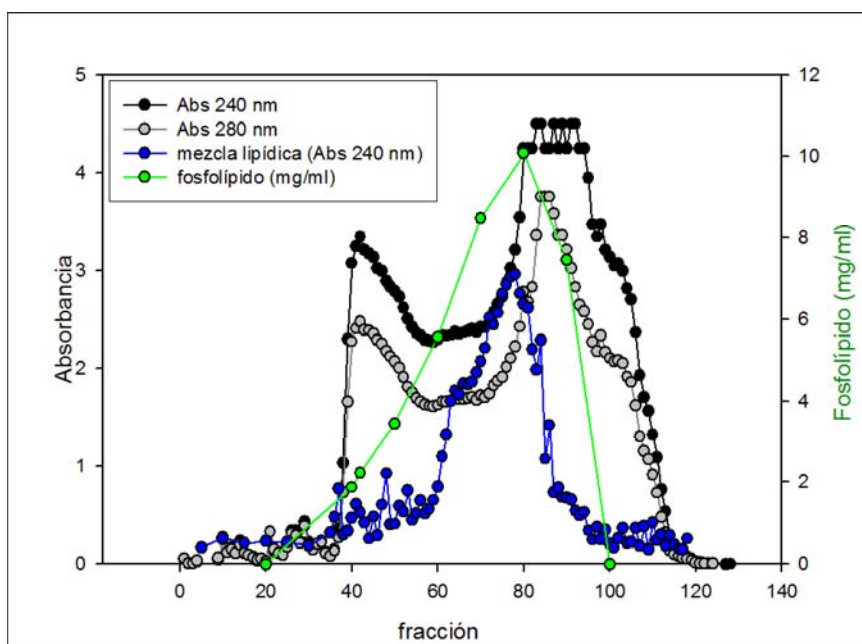
proteína en los picos 1 y 2 de las muestras reconstituidas en proporciones lípido/proteína 100:1, mientras que en la muestra con relación lípido/proteína 50:1 tan sólo se aprecia SP-B en el pico 3. En los geles de electroforesis no fue posible detectar proteína en las fracciones procedentes del fondo de los tubos, excepto por la ligera banda que se observa en la fracción 1 del gel correspondiente a la muestra de SP-B reconstituida con una relación 10:1 lípido/proteína. Esto parece indicar que las relaciones lípido/proteína más bajas no proporcionaban el ambiente adecuado para la reconstitución de complejos estables y definidos de proteína.



**Figura 57.** Análisis electroforético en condiciones reductoras de las fracciones obtenidas mediante centrifugación en gradiente de densidad de la fracción lipídica del surfactante (FL) suplementada con diferentes proporciones de SP-B, una vez solubilizada con detergente. Los geles utilizados contenían un 16% de acrilamida en presencia del agente reductor  $\beta$ -mercaptoetanol. En el carril B se cargó SP-B purificada en disolvente orgánico. Los números 1, 2, 2' y 3 corresponden a las fracciones indicadas en la figura 56.

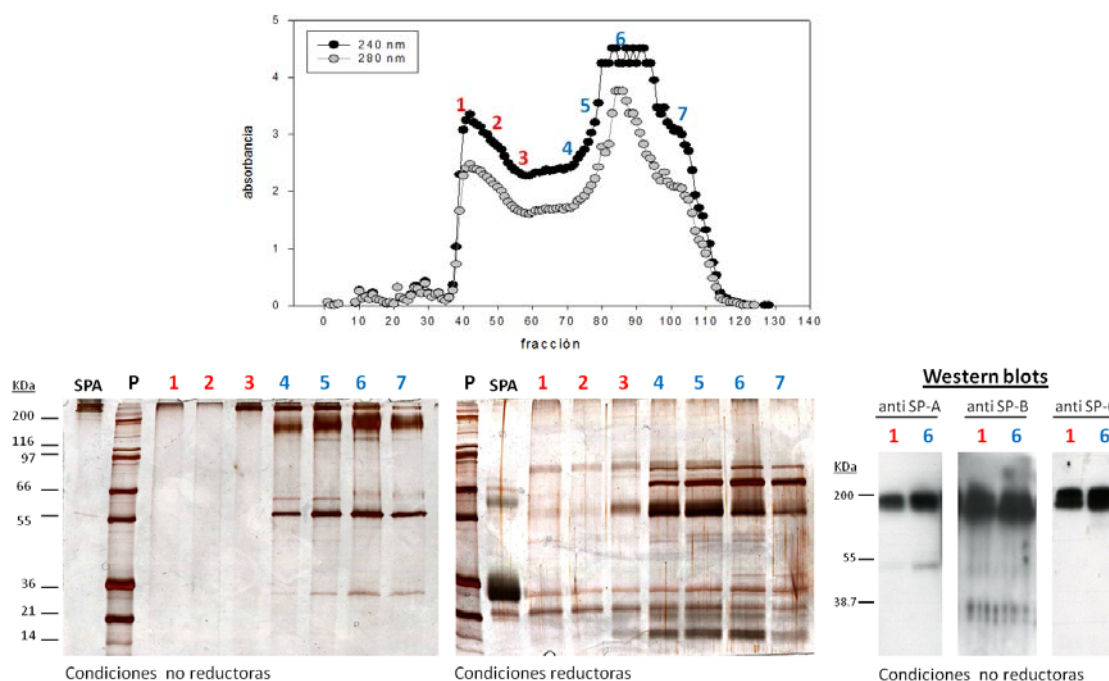
#### 5.2.4. Cromatografía de penetrabilidad de surfactante solubilizado con CHAPS

Dado que la centrifugación en gradiente de densidad no permitió la separación de complejos puros, sino que las muestras obtenidas fueron bastante heterogéneas, se abordó el fraccionamiento de los complejos proteicos del surfactante solubilizado con CHAPS mediante cromatografía de exclusión molecular. Como se observa en la figura 58, la cromatografía en Sephacryl S-400 del surfactante solubilizado en CHAPS permitió obtener dos fracciones diferenciadas en cuanto al tamaño de los complejos. Para estudiar la localización de los lípidos en las fracciones, se obtuvo también el perfil de elución en la cromatografía de una mezcla lipídica DPPC/POPC/POPG/colesterol (50:25:15:10) rehidratada y solubilizada con CHAPS, y además se determinó la concentración de lípido en las diversas fracciones de la cromatografía del surfactante solubilizado. Los resultados muestran que el primer pico de proteína, que contiene los complejos de mayor tamaño, no se encuentra asociado al lípido, mientras que el segundo pico estaría formado por fracciones con componentes de un tamaño menor y con mayor contenido en fosfolípidos.



**Figura 58.** Perfil de elución de la cromatografía de penetrabilidad en Sephacryl S-400 de surfactante solubilizado con CHAPS. Se muestra en azul el perfil de elución, recogido en fracciones de 0.5 ml, de la cromatografía de una muestra de DPPC/POPC/POPG/colesterol (50:25:15:10) (p/p/p/p) solubilizada con CHAPS, que se utilizó para saturar de lípido la columna antes de cargar el surfactante. En verde se muestra la concentración de fosfolípido de las fracciones de la columna determinada mediante valoración de fósforo de éstas.

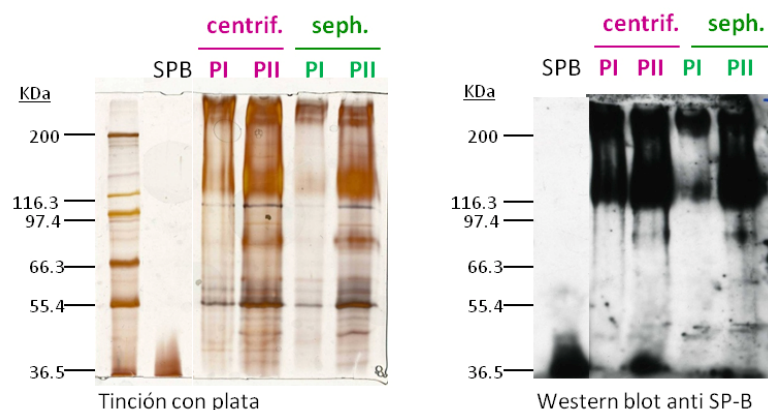
El comportamiento electroforético de las diversas fracciones de la cromatografía aparece en la figura 59. Como se muestra en los geles teñidos con plata, el patrón de bandas de los dos picos resueltos en la cromatografía es radicalmente diferente, resultando más evidentes las diferencias entre ambos en la electroforesis en condiciones no reductoras, en la que se observa que las fracciones del primer pico son de gran tamaño y no entran en el gel, mientras que en el segundo pico aparecen bandas de aproximadamente 200, 60, 55 y 35 kDa. La comparación de estas muestras con la SP-A control sin reducir sugiere que, al menos en el caso de las bandas de 60, 55 y 30 kDa, debe existir otra proteína además de la SP-A, ya que ésta no penetró en el gel al porcentaje de acrilamida utilizado (12%). La adición del agente reductor al tampón de carga de la electroforesis produjo la aparición de un gran número de bandas, la mayoría de ellas de igual movilidad en las fracciones correspondientes a ambos picos, aunque más tenues en las del primero de ellos: 93, 60, 45, 26, 22, 20 y 17 kDa. Algunas de las bandas podrían corresponder al monómero y oligómeros de SP-A, tal como se observa al comparar las muestras con la SP-A control en condiciones reductoras. Cabe destacar la presencia de una banda exclusiva del segundo pico de la cromatografía, aproximadamente de 80 kDa.



**Figura 59.** Análisis electroforético mediante tinción con plata y Western blot de las fracciones obtenidas mediante cromatografía de penetrabilidad Sephacryl S400 de surfactante solubilizado con CHAPS. En todos los casos se utilizaron geles al 12% de acrilamida.

Por otro lado, el estudio mediante Western blot en condiciones no reductoras de las proteínas del surfactante presentes en las dos fracciones resueltas en la cromatografía, reveló la presencia de SP-A, SP-B y SP-C en las bandas de elevada masa molecular, de SP-A en la banda de 55 kDa y de SP-B en la banda de 35 kDa.

Para evaluar la aparición de agregados de mayor masa molecular en las diferentes fracciones de la cromatografía, se realizó una electroforesis de los dos picos de la cromatografía en condiciones no reductoras en geles de menor porcentaje de acrilamida (8%). Este análisis resultó en la aparición de bandas de proteína que coinciden perfectamente con las bandas de los dos tipos de complejos separados mediante la centrifugación en gradiente de densidad (figura 60). En ambos tipos de separación los picos I se separaron en una serie de bandas que están también presentes en los picos II pero de forma más tenue en los primeros (bandas superiores a 200 kDa, y bandas en torno a 120 y 55 kDa). Además de estas bandas, en el pico II aparecen en ambos casos bandas de masa molecular aproximada de 110, 80, 65, 60 y 45 kDa. La presencia de SP-B en ambos picos fue estudiada mediante Western blot (figura 60), encontrándose dicha proteína en las bandas de más de 200 kDa y 120 kDa en ambos picos, y en las bandas de 88, 66 y 45 kDa del pico II.



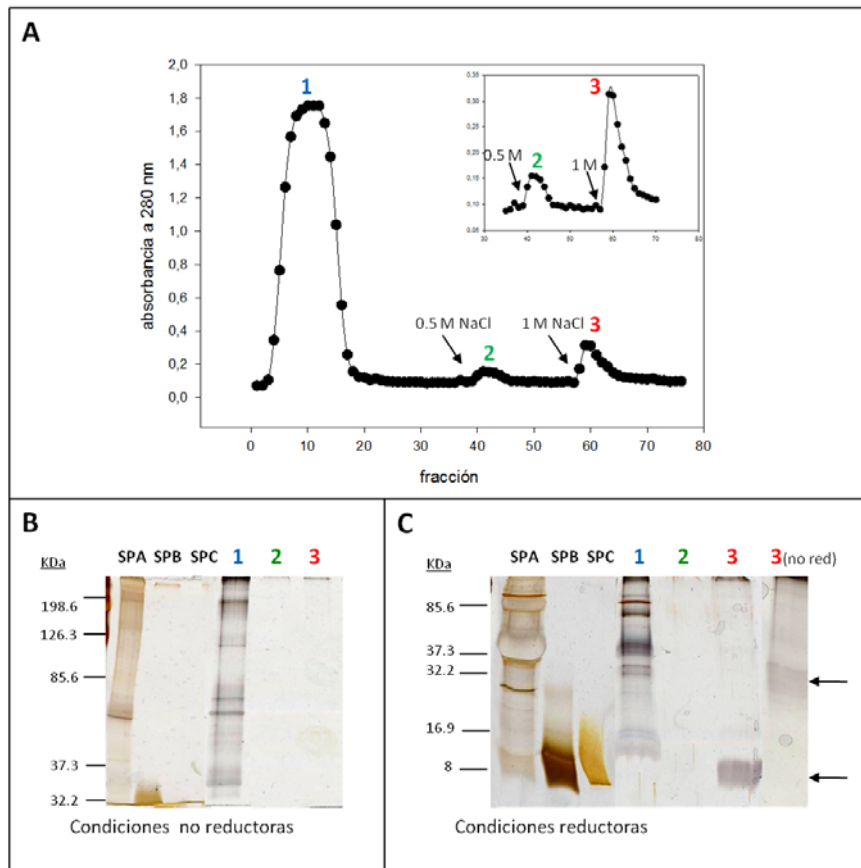
**Figura 60.** Comparación del comportamiento electroforético de las fracciones de los dos picos (PI y PII) separados mediante centrifugación en gradiente de densidad (en rosa) o cromatografía en sephacryl S400 (en verde) de surfactante solubilizado con CHAPS. Las electroforesis se realizaron en geles al 8% de acrilamida y en condiciones no reductoras, para comparar las bandas de alta masa molecular encontradas en las diversas fracciones.

La coincidencia del comportamiento electroforético de los complejos obtenidos mediante la centrifugación en gradiente de sacarosa y la cromatografía de penetrabilidad indica la presencia principalmente de dos tipos de complejos proteicos en el surfactante tras su solubilización con CHAPS y el análisis en condiciones no desnaturizantes ni reductoras: por un lado complejos de gran tamaño y alta densidad, y por otro lado complejos más pequeños que los anteriores, asociados a los lípidos del surfactante y por tanto de menor densidad. La composición proteica de dichos tipos de complejos sería cualitativamente similar, estando ambos constituidos por varias proteínas del surfactante (SP-A, SP-B y SP-C), aunque existiría una diferente asociación de las proteínas en ellos, como muestra el distinto patrón de bandas cuando se comparan los dos picos tras su desnaturización con SDS en la electroforesis.

### 5.2.5. Cromatografía de intercambio iónico de surfactante solubilizado con CHAPS

Considerando la heterogeneidad proteica de los complejos obtenidos mediante separación por centrifugación en gradiente de densidad y cromatografía de penetrabilidad del surfactante solubilizado en CHAPS, y dado que las proteínas del surfactante SP-B y SP-C, al contrario que la SP-A, poseen carga neta positiva, se realizó una cromatografía de intercambio catiónico en la resina Hitrap SP del surfactante solubilizado en detergente. De esta manera se pretendió la separación de complejos que pudieran estar enriquecidos en SP-B y cuya potencial oligomerización fuera independiente de la presencia de SP-A, que siempre estaba presente como proteína mayoritaria en los complejos obtenidos anteriormente con los otros dos métodos de purificación.

Como se observa en el perfil de elución de la columna Hitrap SP en la figura 61A, la mayor parte de los complejos pasaron a través de la resina rápidamente, eluyendo en un primer pico que no se retiene en la columna y que por tanto estaría formado por proteínas y complejos de carga neta negativa, incluyendo la SP-A. Para eluir las proteínas retenidas en la columna fue necesario aumentar drásticamente la fuerza iónica, eluyendo un primer pico de baja absorbancia a 0.5M de NaCl, y finalmente un pico de proteínas fuertemente unidas a la resina que eluyó a una concentración de sal 1M.

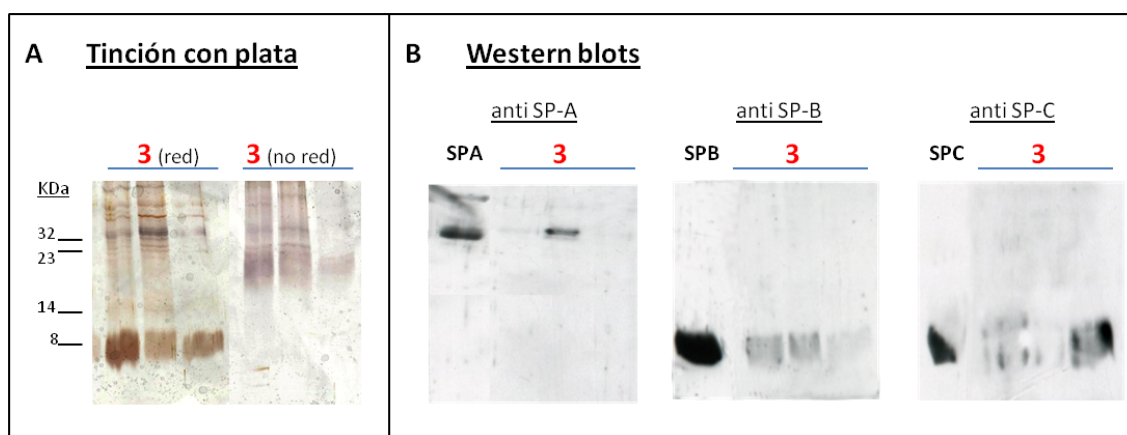


**Figura 61.** A. Perfil de elución de la cromatografía de intercambio iónico Hitrap SP de surfactante solubilizado con CHAPS. El pico 1 corresponde a las proteínas no retenidas, mientras que los picos 2 y 3 contienen proteínas que quedaron retenidas en la columna y que fueron eluidas al aumentar la fuerza iónica del tampón a 0.5M y 1M respectivamente. B. Las fracciones correspondientes a cada uno de los 3 picos obtenidos se cargaron en un gel al 8% de acrilamida en condiciones no reductoras. C. Electroforesis en condiciones reductoras en un gel al 16% de acrilamida, y también en el último carril se cargó la fracción número 3 sin agente reductor.

El estudio electroforético de las fracciones resultantes de la cromatografía se muestra en la figura 61B, en la que se puede observar que en condiciones no reductoras no aparecieron bandas en las fracciones de proteína retenida en la columna cuando se

cargaron en un gel de bajo porcentaje de acrilamida (8%), mientras que en un gel al 16% se observó una banda de aproximadamente 30 kDa (último carril del gel de la figura 61C) en la fracción eluída con NaCl 1M. En ninguna de las condiciones ensayadas aparecieron bandas en el pico 2 de la cromatografía, eluído con 0.5M de NaCl, lo cual se debe probablemente a la baja cantidad de proteína presente en estas fracciones. En el primer pico de la cromatografía se observó un patrón electroforético similar al de la SP-A en condiciones no reductoras, con bandas en torno a 200 y 80 kDa. En este primer pico no obstante, se observó también la presencia de bandas diferentes a las de la SP-A, a 120 y 34 kDa, indicando ésta última la presencia de al menos otra proteína además de la SP-A en la fracción no retenida, probablemente SP-B. La no retención en la resina de esta fracción de SP-B con carga positiva, podría sugerir por tanto la existencia de interacciones entre SP-A y SP-B. Por otro lado, el desarrollo de la electroforesis de las fracciones en condiciones reductoras (figura 62) confirmó la presencia de una proteína de baja masa molecular en el primer pico de la cromatografía, y reveló la presencia de una única banda de aproximadamente 8 kDa en el caso de la fracción proteica eluída con 1M NaCl.

El análisis de la composición proteica mediante inmunodetección de la fracción retenida en la cromatografía de intercambio iónico se muestra en la figura 62B. Estos ensayos permiten confirmar que las bandas de baja masa molecular estaban constituidas principalmente por SP-B y en menor grado SP-C, aunque no se puede descartar la presencia de monómeros de SP-A como se muestra en la figura. No obstante, la caracterización estructural de los complejos proteicos retenidos en la cromatografía se llevó a cabo con las fracciones de purificaciones en las que se comprobó la ausencia de SP-A mediante Western blot.



**Figura 62.** Análisis de las proteínas retenidas en la columna de intercambio iónico Hitrap SP (pico 3) procedentes de tres purificaciones distintas. Para tinción con plata (A) se utilizaron geles al 16% de acrilamida, en condiciones reductoras (red) o no reductoras (no red), y para realizar Western blots (B) todas las muestras fueron analizadas en condiciones reductoras en geles al 16% de acrilamida.



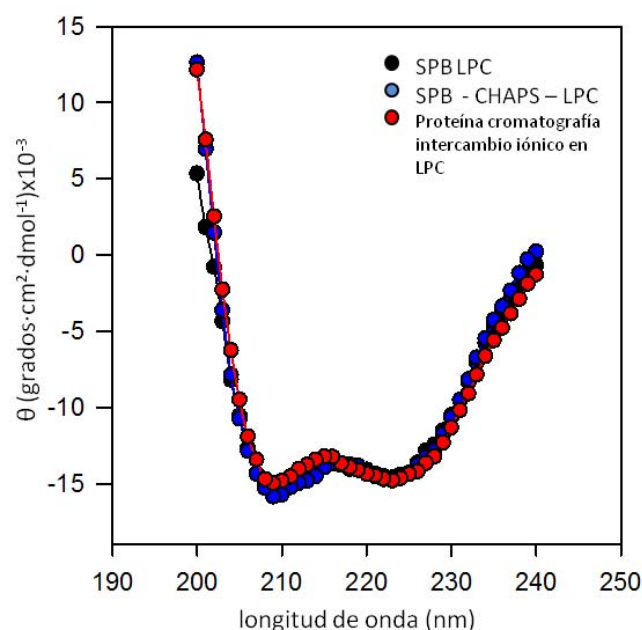
## **5.2.6. Caracterización estructural de la proteína purificada mediante cromatografía de intercambio iónico de surfactante solubilizado en CHAPS**

### **5.2.6.1. Estudio de la estructura secundaria mediante dicroísmo circular**

Para caracterizar la estructura secundaria de la proteína retenida en la cromatografía de intercambio iónico se obtuvieron espectros de dicroísmo circular. Tanto en los experimentos de dicroísmo como en los de emisión de fluorescencia la proteína purificada en detergente se comparó con la SP-B obtenida en disolvente orgánico ya que se comprobó que dicha fracción estaba constituida principalmente por un 85% en peso de SP-B frente a un 15% de SP-C.

Para eliminar el detergente de la muestra y favorecer su incorporación en micelas que mimetizaran el entorno de la bicapa lipídica, se dializó la proteína en presencia de LPC. También se estudiaron los espectros de dos controles que consistieron en SP-B procedente de un aislamiento en disolvente orgánico y reconstituida en LPC, y SP-B purificada en disolvente orgánico, solubilizada con CHAPS y finalmente dializada en presencia LPC. Con esto se comprobó el efecto de las posibles trazas de detergente residuales tras la diálisis, así como la posible influencia de la presencia temporal de detergente en la estructura de la proteína.

Los espectros de dicroísmo circular obtenidos en el ultravioleta lejano se muestran en la figura 63. En las tres proteínas estudiadas el espectro es muy similar, apareciendo dos mínimos de elipticidad negativa a 209-210 y 222-223 nm, característicos de proteínas con estructura secundaria mayoritariamente en  $\alpha$ -hélice. El contenido en  $\alpha$ -hélice estimado en función de los espectros obtenidos (tabla 1) corresponde a un 52% en el caso del control de SP-B en LPC y un 59% para la proteína purificada en detergente, lo que indica que ambas poseen una estructura secundaria similar, encontrándose un pequeño incremento del contenido en  $\alpha$ -hélice en la proteína purificada en detergente, y en el control de SP-B obtenida en disolvente orgánico, solubilizado con CHAPS y dializado frente a LPC. Estas diferencias podrían deberse realmente a cambios estructurales debido al efecto del CHAPS en las proteínas, o bien a la presencia de trazas residuales tras la diálisis. El mayor porcentaje de  $\alpha$ -hélice de la proteína purificada en detergente podría deberse a la presencia de una fracción minoritaria de SP-C, con mayor contenido helicoidal que la SP-B. Esto no explicaría, no obstante, la mayor helicidad de la SP-B purificada en disolvente y temporalmente expuesta a detergente.



**Figura 63.** Espectro de dicroísmo circular de la proteína retenida en la columna de intercambio iónico (rojo) en LPC tras la diálisis del CHAPS. Para su comparación se muestran también los espectros de dos controles consistentes en SP-B purificada en disolvente orgánico reconstituida en LPC (negro) y SP-B purificada en disolvente orgánico reconstituida en CHAPS y posteriormente dializada frente a LPC (azul).

| Muestra                                       | % $\alpha$ | % $\beta$ | % T        | % R        |
|-----------------------------------------------|------------|-----------|------------|------------|
| SPB LPC                                       | 52 $\pm$ 1 | 6 $\pm$ 1 | 16 $\pm$ 2 | 26 $\pm$ 3 |
| SPB-CHAPS-LPC                                 | 58 $\pm$ 4 | 7 $\pm$ 3 | 15 $\pm$ 2 | 20 $\pm$ 3 |
| Proteína columna<br>intercambio iónico en LPC | 57 $\pm$ 2 | 7 $\pm$ 3 | 16 $\pm$ 1 | 20 $\pm$ 3 |

**Tabla 1.** Estructura secundaria, determinada a partir de los espectros de dicroísmo circular (figura 63), de la proteína retenida en la columna de intercambio iónico (rojo) en LPC tras la diálisis del CHAPS y de la SP-B purificada en disolvente orgánico reconstituida en LPC (negro) ( $\alpha$ :  $\alpha$ -hélice,  $\beta$ : lámina  $\beta$ , T: giros  $\beta$ , R: estructura desordenada).

#### 5.2.6.2. Estudio de la estructura terciaria mediante espectroscopía de fluorescencia

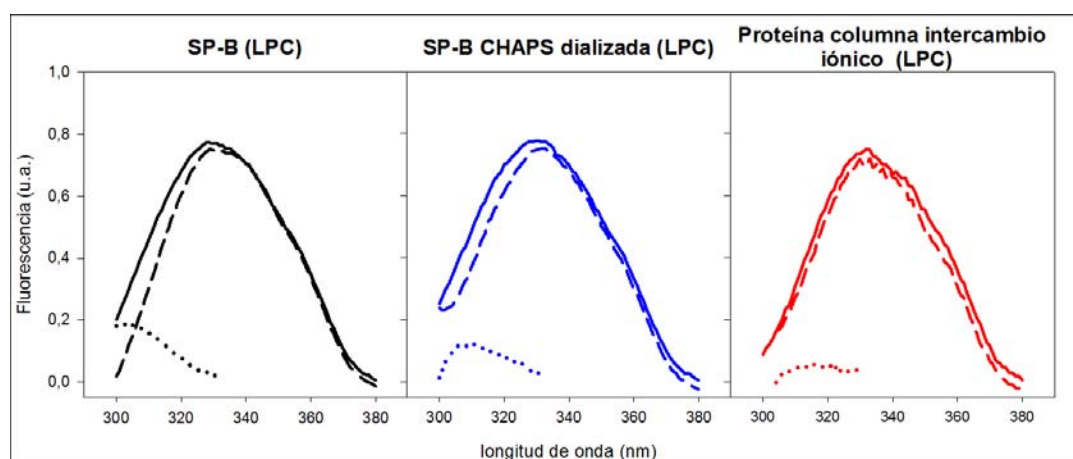
La estructura terciaria de la proteína retenida en la cromatografía de intercambio iónico fue estudiada también mediante la obtención de los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de la proteína. Cada monómero de SP-B contiene un único triptófano, que puede ser utilizado como una sonda fluorescente intrínseca que proporciona información sobre la estructura en la región en la que se encuentra dicho



residuo, ya que es muy sensible a los cambios producidos en su ambiente local. Por otro lado, la ausencia de aminoácidos aromáticos en la SP-C conlleva a que los espectros de emisión de fluorescencia procedente de la fracción de proteína purificada en detergente sean únicamente debidos a la SP-B.

Al igual que en los experimentos de dicroísmo circular, el detergente fue eliminado mediante una diálisis frente a LPC y se obtuvo el espectro de emisión de la proteína tras excitación a 275 nm o 295 nm. También se estudiaron los espectros de los dos controles de SP-B purificada en disolvente orgánico y reconstituida directamente en micelas de LPC o solubilizada con CHAPS y posteriormente dializada frente a LPC.

Como se observa en la figura 64, el espectro de emisión del control de SP-B en LPC presentó un máximo de emisión a 330 nm cuando se excitó a 275 nm y un máximo de emisión a 332 nm al excitar a 295 nm (tabla 2). La SP-B purificada en disolvente orgánico, solubilizada con CHAPS y dializada a LPC, mostró un espectro de emisión muy similar al control anterior, con máximos en longitudes de onda prácticamente iguales a la SP-B que no pasó por detergente. Por último, el espectro de la proteína retenida en la columna de intercambio iónico en LPC fue también muy similar a los dos controles estudiados, con un ligero incremento en la longitud de onda de los máximos de emisión. Los centros espectrales de masas calculados para los espectros fueron igualmente similares en los dos controles, observándose también un pequeño desplazamiento del máximo al rojo en el caso de la proteína purificada en detergente. Los desplazamientos del máximo de emisión hacia el rojo en los espectros de la proteína purificada en detergente (2 nm al excitar a 275 nm y 1 nm en la excitación a 295 nm) podrían sugerir una exposición del triptófano a un ambiente ligeramente más polar.



**Figura 64.** Espectros de emisión de fluorescencia de la proteína retenida en la cromatografía de intercambio iónico en LPC (rojo) tras la diálisis del CHAPS, de SP-B purificada en disolvente orgánico reconstituida en LPC (negro) y de SP-B purificada en disolvente orgánico reconstituida en CHAPS y posteriormente dializada a LPC (azul). En línea continua se muestra el espectro de emisión tomado utilizando como longitud de onda de excitación 275 nm, en línea discontinua el espectro excitando a 295 nm (triptófano), y en línea de puntos la contribución de las tirosinas obtenida tras restar los dos espectros anteriores.

| Muestra                                      | $\lambda$ máxima de emisión (nm) |                     | SCM (nm)            |                     |
|----------------------------------------------|----------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|                                              | Excitación a 275 nm              | Excitación a 295 nm | Excitación a 275 nm | Excitación a 295 nm |
| SPB LPC                                      | 330                              | 332                 | 335                 | 336                 |
| SPB-CHAPS-LPC                                | 330                              | 331                 | 335                 | 336                 |
| Proteína columna<br>intercambio iónico (LPC) | 332                              | 333                 | 337                 | 337                 |

**Tabla 2.** Longitudes de onda de los máximos de emisión de fluorescencia y centro espectral de masas (SCM) por excitación a 275 y 295 nm, de la proteína retenida en la columna de intercambio iónico (rojo) en LPC tras la diálisis del CHAPS, la SP-B purificada en disolvente orgánico reconstituida en LPC (negro) y la SP-B purificada en disolvente orgánico reconstituida en CHAPS y posteriormente dializada a LPC (azul).

### 5.2.7. Caracterización funcional de las partículas proteicas obtenidas mediante la cromatografía de intercambio iónico

Una vez caracterizados estructuralmente los complejos proteicos purificados en detergente se llevó a cabo un estudio funcional en el surfactómetro de burbuja cautiva (CBS) de complejos lipoproteicos que incorporan esta forma de la proteína, y se comparó con la actividad interfacial de SP-B purificada en disolvente orgánico.

Tal y como se explica en el apartado 3.6.2. de Materiales y Métodos, la proteína fue incluida en complejos lípido-proteína de dos formas diferentes: por incorporación a vesículas unilamelares grandes (LUVs) de lípido ya formadas o por exposición a películas de lípido secas y formación de suspensiones multilamelares (MLVs) ya en presencia de la proteína. Tras la reconstitución por cualquiera de estos dos métodos, el detergente fue eliminado de las muestras mediante la utilización de BioBeads, y posteriormente las muestras fueron concentradas mediante ultracentrifugación para su ensayo en el CBS.

La proteína se reconstituyó de estas dos formas en vesículas conteniendo distinta composición lipídica e incluyendo o no SP-C procedente de aislamiento en disolvente orgánico: a) DPPC/POPC/POPG (50:25:15), b) DPPC/POPC/POPG + SP-C (0.6% p/p), c) fracción lipídica completa del surfactante, o d) fracción lipídica completa del surfactante + SP-C (0.6% p/p). Para cada una de estas preparaciones se ensayaron además las propiedades tensioactivas de dos controles. En primer lugar se prepararon también suspensiones puramente lipídicas sin la proteína purificada en detergente, pero añadiendo el volumen equivalente del tampón de elución de la proteína, que contenía por tanto detergente. Estas suspensiones lipídicas expuestas a detergente fueron tratadas con BioBeads de la misma manera que las muestras conteniendo proteína aislada en CHAPS. Estos controles muestran por tanto el efecto tensioactivo de las posibles trazas de detergente residual en las preparaciones. Por otra parte, para comparar la acción de la proteína con la de SP-B purificada en disolvente orgánico, ésta fue reconstituida

también en las mismas mezclas lipoproteicas utilizadas para la proteína en detergente, y en todos los casos al encontrarse en disolvente orgánico, la reconstitución supuso la mezcla de proteína y lípido en solución orgánica previa a la formación de MLVs.

Para resumir el comportamiento en el CBS de las muestras estudiadas se indican en la **Tabla 3** (página 152) los parámetros más importantes de los ensayos realizados.

### **Elección de la concentración de proteína en la actividad de complejos lipoproteicos ensayados en el CBS**

Para cada una de las formas de proteína ensayada, bien la forma purificada en detergente, bien purificada en disolvente orgánico, se probaron diferentes proporciones de proteína con respecto al lípido para determinar cuál es la mínima cantidad de proteína necesaria para lograr una buena función tensioactiva.

#### *SP-B purificada en disolvente orgánico*

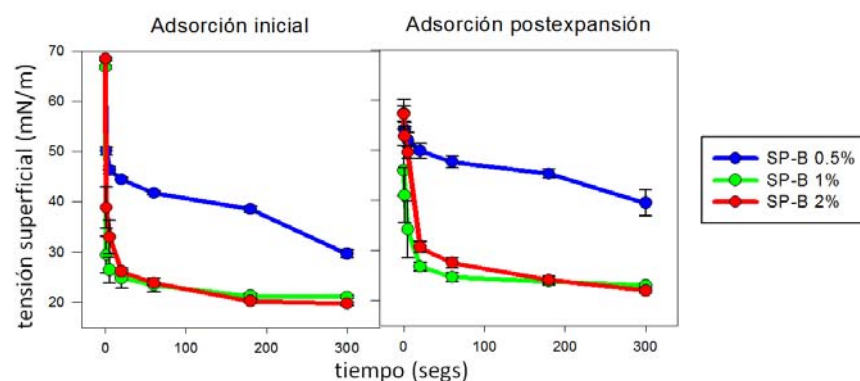
En la figura **65** se muestra la actividad en el CBS de preparaciones conteniendo 3 diferentes concentraciones de SP-B, 0.5%, 1% y 2% (p/p) en una mezcla lipídica de DPPC/POPC/POPG.

En un experimento típico de CBS la aplicación del material en la cámara conlleva la adsorción inicial de la muestra a la interfase aire-líquido de la burbuja y una acumulación del material en esta interfase, obteniéndose una cinética de reducción de la tensión superficial que produce en pocos segundos tensiones superficiales de equilibrio que para el surfactante pulmonar nativo están entre 23-25 mN/m. En la cinética de adsorción inicial de muestras conteniendo tan sólo 0.5% de SP-B se observa cómo el material no es capaz de disminuir la tensión superficial hasta valores de equilibrio en los 5 minutos del experimento (figura **65A**). Lo mismo ocurre cuando se expande la burbuja a un volumen definido y se esperan otros 5 minutos para que el material se siga adsorbiendo (adsorción post-expansión), no alcanzándose ni siquiera los valores de tensión mínima tras la adsorción inicial.

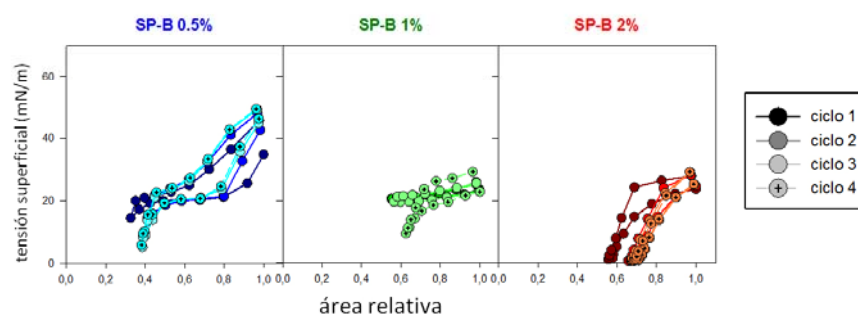
En el protocolo estandarizado para los experimentos de CBS, tras la última cinética de adsorción postexpansión, la burbuja es sometida a cuatro ciclos de compresión-expansión cuasiestática, que suponen la obtención de isothermas en pasos discretos de compresión o expansión, con 4 segundos de equilibrado entre cada paso y 1 minuto al final de cada expansión. Durante estos ciclos se observa que el lípido que contiene sólo un 0.5% de SP-B no es capaz de alcanzar valores de tensión superficial mínima menores a 5 mN/m durante el primer ciclo de compresión, y aunque en los ciclos posteriores sí se llega a tensiones superficiales mínimas de ese orden, esto sólo ocurre con una reducción de área muy importante, aproximadamente de un 60%. Además se observa la existencia de histéresis en todos los ciclos, lo que significa que se está produciendo pérdida del material debido a una baja estabilidad de la película interfacial y a una reducida reincorporación de material durante la expansión, lo que

también da lugar a tensiones superficiales máximas progresivamente más elevadas según progresan los ciclos. Esto indica que el material no es capaz de recuperar y mantener la tensión de equilibrio tras la expansión.

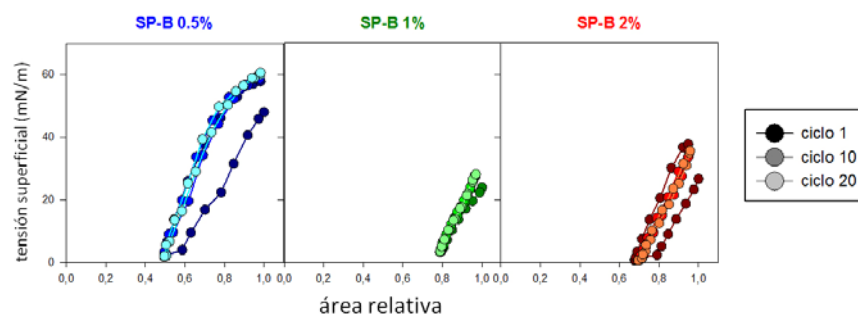
**A Cinéticas de adsorción interfacial de distintas proporciones de SP-B en la mezcla lipídica sintética DPPC/POPC/POPG**



**B Ciclos cuasiestáticos**



**C Ciclos dinámicos**



**Figura 65.** Estudio funcional en CBS de suspensiones multilamelares de DPPC/POPC/POPG (50:25:15) conteniendo diferentes proporciones (en peso) de SP-B purificada en disolvente orgánico. En **A** se muestran la adsorción inicial y post-expansión de las composiciones ensayadas, representándose para cada una de ellas la media de 3 repeticiones diferentes. En **B** y **C** se muestran experimentos representativos del comportamiento de las muestras sometidas a ciclos de compresión-expansión cuasiestáticos y dinámicos.

Por último se obtuvieron isothermas tras la aplicación de ciclos de compresión-expansión dinámica a una velocidad de 20 ciclos por minuto, lo que refleja aproximadamente el ciclo respiratorio normal. En ellos se alcanzaron valores de tensión mínima menores o iguales a 2 mN/m, pero existiendo todavía algo de histéresis en los primeros ciclos, y sin recuperarse las tensiones de equilibrio en ninguno de los 20 ciclos realizados, alcanzándose siempre tras la expansión tensiones superficiales máximas muy elevadas. Teniendo en cuenta estos resultados concernientes a la adsorción interfacial y a la dinámica de compresión-expansión, se puede afirmar que una concentración de SP-B del 0.5% en peso no es suficiente para proporcionar una función tensioactiva eficiente en la mezcla lipídica y en las condiciones ensayadas.

Cuando se ensayaron concentraciones de 1% o 2% de SP-B los experimentos de adsorción, tanto inicial como post-expansión, reflejaron cinéticas muy rápidas, alcanzándose en tiempos muy cortos tensiones superficiales de equilibrio de entre 21-23 mN/m. Durante los ciclos cuasiestáticos la SP-B al 1% no alcanzó valores mínimos de tensión superficial hasta el ciclo 4, aunque a diferencia de lo ocurrido en la muestra conteniendo sólo un 0.5% de SP-B, el porcentaje de área comprimida requerida en dicho ciclo no fue tan elevado, en torno al 30%. Los ciclos tuvieron poca histéresis y la tensión de equilibrio tras las expansiones se recuperó normalmente, sin generarse tensiones máximas elevadas. Durante los ciclos dinámicos, la muestra conteniendo 1% de SP-B mostró un comportamiento tensioactivo óptimo, alcanzándose desde el primer ciclo tensiones mínimas cercanas a cero, con una compresión del área de tan sólo el 20%, sin observarse histéresis, y manteniéndose bajas las tensiones máximas tras las sucesivas expansiones de la película. Por último, las muestras ensayadas conteniendo la mayor concentración de SP-B, 2% en peso, alcanzaron tensiones mínimas durante los 4 ciclos cuasiestáticos con una reducción de área de menos del 30%, exhibiendo además ausencia de histéresis desde el ciclo 2, y bajas tensiones superficiales máximas. En los ciclos dinámicos, las muestras con un 2% de SP-B mostraron un comportamiento algo menos eficaz en comparación con las muestras con 1% de SP-B, ya que a pesar de producir valores muy bajos de tensión superficial mínima, el porcentaje de área comprimida necesario para alcanzarla fue algo mayor, la histéresis fue mayor en los primeros ciclos, y la tensión superficial máxima tras las expansiones fue en todos los ciclos superior a la tensión de equilibrio.

En función de estos resultados, se escogió la concentración de 1% de SP-B como la proporción óptima para ensayar esta proteína en el CBS, ya que concentraciones menores resultaron inefectivas, y concentraciones superiores no supusieron un incremento importante de la funcionalidad de la mezcla lipoproteica.

#### *Proteína purificada en detergente*

Para aproximar al máximo las condiciones de ensayo a las de la SP-B purificada en disolvente orgánico, la proteína purificada en detergente se reconstituyó inicialmente en la mezcla lipídica DPPC/POPC/POPG formando MLVs ya en presencia de proteína.

En la figura **66** se muestran los resultados de los experimentos de CBS realizados con tres concentraciones de proteína, que corresponden al 1%, 2% y 3% (p/p) respecto al lípido.

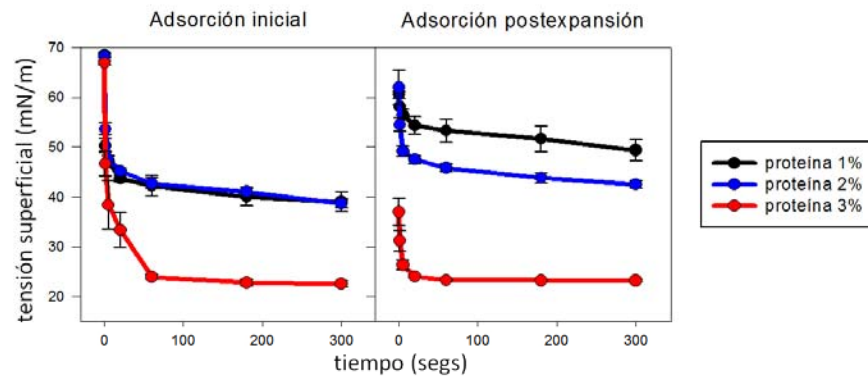
Como se puede observar en las gráficas correspondientes a la adsorción inicial y post-expansión (figura **66A**), las mezclas lipídicas conteniendo 1% o 2% de proteína no son capaces de alcanzar tensiones superficiales de equilibrio, y sólo con la adición de un 3% de proteína se observan comportamientos eficaces de adsorción del material, con reducción de la tensión superficial a valores en torno a 23 mN/m.

En los ciclos cuasiestáticos (figura **66B**) las concentraciones de 1 y 2% de proteína dieron lugar a tensiones mínimas de aproximadamente 20 mN/m, tensiones máximas elevadas tras la expansión e histéresis durante los 4 ciclos realizados. El material con 3% de proteína mejoró en comparación a las concentraciones menores en cuanto al mantenimiento de la tensión máxima cercana a los valores de equilibrio, aunque en todos los ciclos cuasiestáticos la tensión superficial mínima se mantuvo muy elevada.

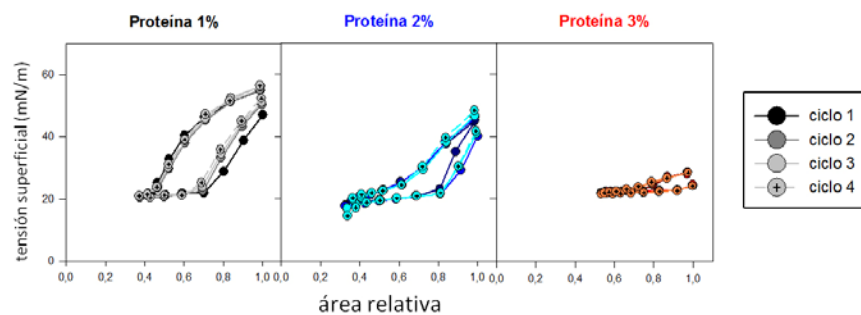
En los ciclos dinámicos (figura **66C**) el comportamiento de las mezclas con 1% de proteína continuó siendo ineficaz en todos los parámetros registrados, mientras que las muestras que contenían un 2% de proteína sí alcanzaron tensiones mínimas cercanas a cero con compresiones de área de un 40%, aunque las tensiones máximas alcanzadas al final de la expansión permanecieron muy elevadas. Las mezclas conteniendo 3% de proteína, sin embargo, mostraron un comportamiento eficaz en todos los aspectos, alcanzando tensiones mínimas con compresiones de área del 23%, sin prácticamente histéresis.

En base a estos resultados se consideró necesaria la introducción de una concentración de proteína del 3% en las mezclas lipídicas para alcanzar un buen nivel de funcionalidad de la proteína purificada en detergente en los experimentos de CBS.

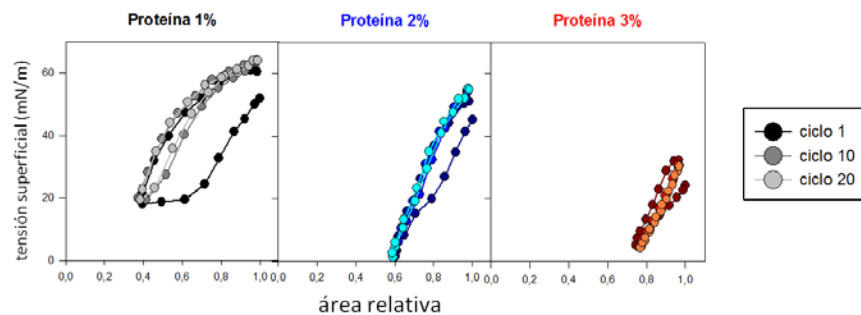
**A Cinéticas de adsorción interfacial de distintas proporciones de la proteína incorporada a MLVs de la mezcla lipídica sintética DDPG/POPC/POPG**



**B Ciclos cuasiestáticos**



**C Ciclos dinámicos**



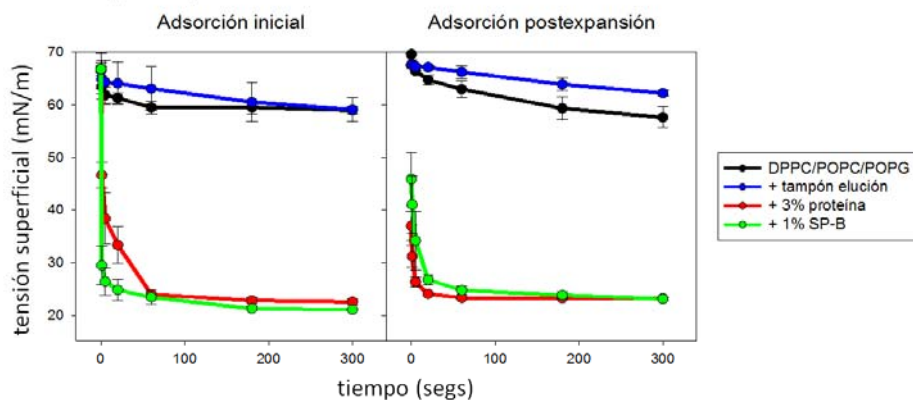
**Figura 66.** Estudio funcional mediante CBS de diferentes proporciones de la proteína purificada con la columna de intercambio iónico reconstituida en suspensiones multilamelares de DPPC/POPC/POPG. En **A** se muestran la adsorción interfacial inicial y post-expansión de las 3 proporciones de proteína ensayadas, representándose para cada una de ellas la media de 3 repeticiones diferentes. En **B** y **C** se muestran experimentos representativos del comportamiento de las muestras sometidas a ciclos de compresión-expansión cuasiestáticos y dinámicos.

**Análisis comparativo de la actividad tensioactiva de la proteína purificada en detergente con respecto a la SP-B purificada en disolvente orgánico**

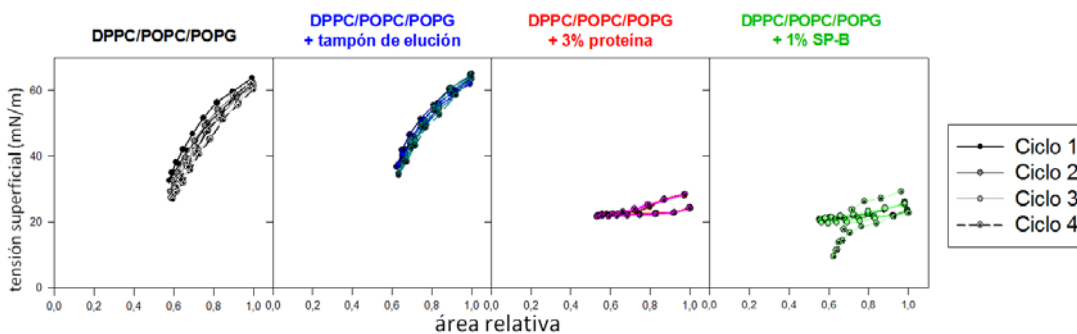
Con fines comparativos, se reúnen en este apartado los resultados de los ensayos en CBS de la proteína purificada en detergente reconstituida al 3% en MLVs de DPPC/POPC/POPG (50:25:15), comparándola con muestras conteniendo SP-B

purificada en disolvente orgánico en la misma mezcla lipídica. Estos resultados son por tanto los mismos expuestos en el apartado anterior incluyendo además como referencia el comportamiento de los dos controles correspondientes al lípido sólo y al lípido expuesto al detergente.

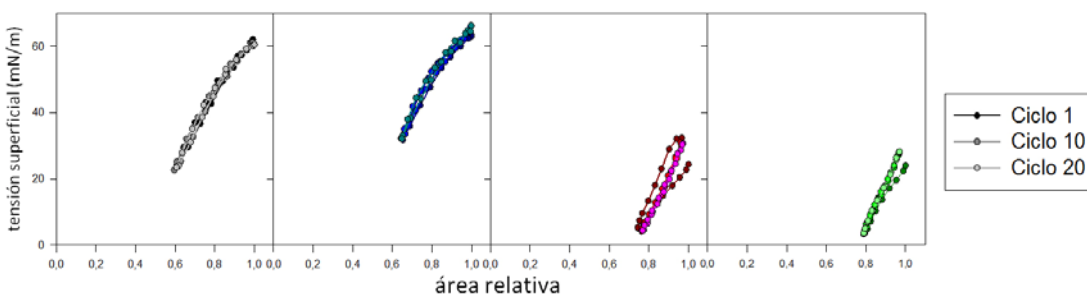
### A Cinéticas de adsorción interfacial de la proteína reconstituida en MLVs de la mezcla lipídica sintética DPPC/POPC/POPG



### B Ciclos cuasiestáticos



### C Ciclos dinámicos



**Figura 67.** Comparación funcional mediante CBS de la proteína purificada en la columna de intercambio iónico (en rojo) y SP-B purificada en disolvente orgánico (en verde) reconstituidas en suspensiones multilamelares de DPPC/POPC/POPG. Se compara también el comportamiento de suspensiones puramente lipídicas pre-expuestas (en azul) o no (en negro) a tampón de elución de la columna, conteniendo CHAPS. En A se muestran la adsorción inicial y post-expansión de las 4 muestras, representándose para cada una de ellas la media de 3 repeticiones diferentes. En B y C se muestran experimentos representativos del comportamiento de las muestras sometidas a ciclos de compresión-expansión cuasiestáticos y dinámicos.



Como se observa en la figura 67 los dos controles mencionados no son capaces de adsorberse a la interfase ni de generar ciclos cuasiestáticos o dinámicos funcionales, lo que resalta por un lado la importancia funcional de la presencia de la proteína en las muestras y por otro la ausencia de función tensioactiva en el control que había sido expuesto al tampón de elución de la columna de intercambio iónico en la que se purifica la proteína, indicando que los resultados obtenidos con la proteína purificada en detergente no son un artefacto debido a la existencia de una cantidad residual de CHAPS en la muestra.

Las dos proteínas, la purificada en detergente y la obtenida en disolvente orgánico, muestran una capacidad de adsorción muy similar, así como un comportamiento análogo en los ciclos dinámicos. La proteína purificada en detergente no fue capaz de alcanzar tensiones superficiales mínimas por debajo de la de equilibrio en los ciclos cuasiestáticos.

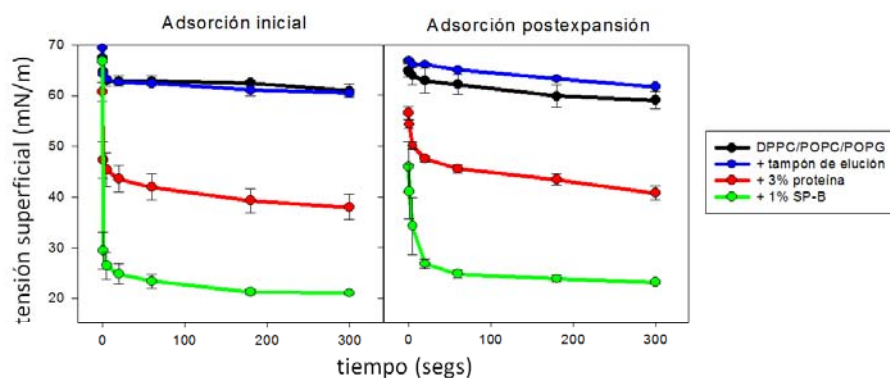
En definitiva, estos resultados indican que la proteína purificada a través de la columna de intercambio iónico posee un comportamiento tensioactivo similar al de la SP-B purificada en disolvente orgánico, confirmando las observaciones bioquímicas y estructurales que apuntaban a una composición de la proteína principalmente constituida por SP-B.

#### **Análisis de la actividad de la proteína purificada en detergente incorporada a LUVs de una mezcla lipídica sintética**

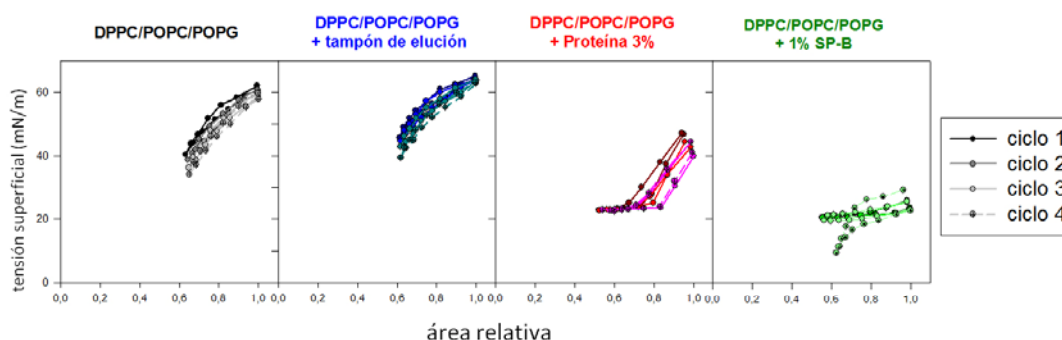
Dado que la manera tradicional de purificar las proteínas hidrofóbicas del surfactante ha sido siempre mediante la utilización de disolventes orgánicos, la reconstitución de SP-B y SP-C en sistemas lipoproteicos se realiza habitualmente a partir de mezclas de lípido y proteína en disolvente orgánico, que posteriormente se secan e hidratan para constituir suspensiones lipoproteicas multilamelares (MLVs) que pueden ser posteriormente convertidas en vesículas unilamelares grandes o pequeñas (LUVs o SUVs). De esta manera se forman bicapas en las que tanto la cara interna como la externa de la bicapa está en principio expuesta a la interacción con la proteína. La obtención de partículas proteicas conteniendo SP-B en detergente, permite la reconstitución de dicha proteína mediante su interacción con el lípido desde el exterior de las vesículas, añadiéndola una vez formadas las LUVs del lípido.

En la figura 68 se muestra el análisis de la actividad biofísica de muestras de proteína reconstituidas en LUVs de DPPC/POPC/POPG (50:25:15) preformadas, así como los correspondientes controles de lípido y lípido con tampón de elución. En la figura se incluye también el control de SP-B en disolvente orgánico reconstituida en forma de MLVs, utilizado en el apartado anterior, para mostrar el comportamiento esperado de una buena preparación tensioactiva.

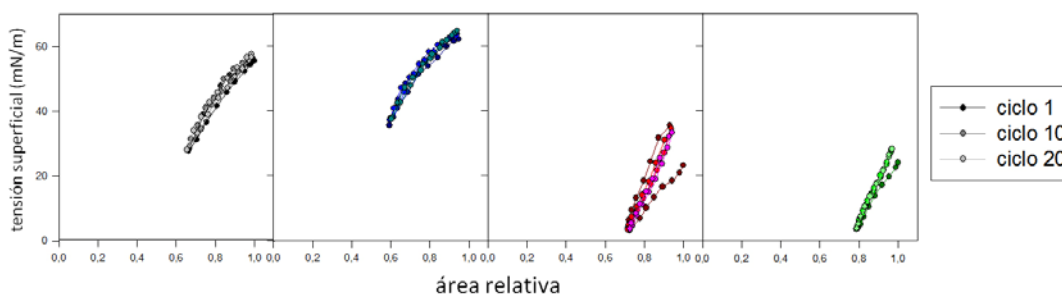
**A Cinéticas de adsorción interfacial de la proteína incorporada a LUVs de la mezcla lipídica sintética DPPC/POPC/POPG**



**B Ciclos cuasiestáticos**



**C Ciclos dinámicos**



**Figura 68.** Estudio funcional mediante CBS de la proteína purificada con la columna de intercambio iónico incorporada a vesículas unilamelares de DPPC/POPC/POPG (50:25:15), en una concentración de 3% de proteína respecto al lípido (p/p) (en rojo). Se ensayaron además dos controles consistentes en LUVs de lípido puro (negro) y LUVs de lípido pre-expuesto al tampón de elución de la columna Hitrap (en azul). Para su comparación se muestra también el comportamiento de membranas de DPPC/POPC/POPG con SP-B purificada en disolvente orgánico (en verde). En **A** se muestran la adsorción inicial y post-expansión de las 4 muestras, representándose para cada una de ellas la media de 3 repeticiones diferentes. En **B** y **C** se muestran experimentos representativos del comportamiento de las muestras sometidas a ciclos de compresión-expansión cuasiestáticos y dinámicos.

Como muestran las gráficas de adsorción interfacial las vesículas que incorporan la proteína de la forma descrita no son capaces de adsorberse para reducir la tensión superficial a valores similares a los de las muestras ensayadas con anterioridad, llegando

tan sólo a alcanzar valores de aproximadamente 40 mN/m. El comportamiento de estas preparaciones se muestra igualmente ineficaz durante la compresión cuasiestática sin que se alcancen tensiones superficiales mínimas cercanas a cero y con tensiones máximas elevadas. No obstante, la proteína así reconstituida mostró actividad suficiente para favorecer la capacidad de las películas lipoproteicas para alcanzar valores de tensión superficial próxima a cero durante los ciclos dinámicos. Durante estos ciclos, su comportamiento se asemejó bastante al de la SP-B purificada en disolvente orgánico, así como al de la propia proteína reconstituida directamente con el lípido en forma de MLVs.

### **Análisis de la actividad de la proteína purificada en detergente reconstituida en MLVs de la fracción lipídica de surfactante**

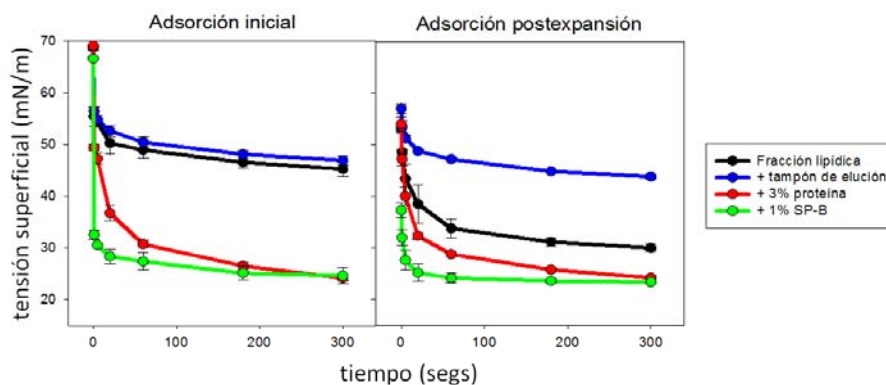
Para estudiar el efecto de la composición lipídica en la función de la proteína purificada en detergente, y determinar hasta qué punto ésta muestra un comportamiento subóptimo con respecto al esperado en su ambiente lipídico, la SP-B purificada en detergente fue también reconstituida en forma de MLVs con la fracción lipídica del surfactante, purificada a través de una extracción orgánica del surfactante posteriormente sometida a cromatografía de penetrabilidad tal y como se describe en el apartado 3.1.1. de materiales y métodos. Además se comparó el efecto de la proteína soluble en CHAPS con SP-B purificada en disolvente orgánico y reconstituida también con fracción lipídica del surfactante.

Ambas, la proteína purificada en detergente y la SP-B obtenida en disolvente orgánico, promueven la adsorción interfacial de suspensiones de la fracción lipídica completa del surfactante, alcanzando rápidamente tensiones superficiales de 24 mN/, (figura 69). La muestra preparada a partir de la proteína purificada en disolvente orgánico parece generar cinéticas de adsorción más rápidas que las de la proteína obtenida en detergente. Puede destacarse que las preparaciones puramente lipídicas se adsorben por sí solas mejor que la mezcla sintética DPPC/POPC/POPG (compárense las cinéticas de adsorción de los lípidos en la figura 69A y 67A), reflejando el carácter posiblemente más dinámico de la composición nativa completa del surfactante. En la adsorción post-expansión, la muestra de lípidos pre-expuesta a detergente se adsorbe peor que la no pre-expuesta, lo que podría indicar que después de todo la exposición al detergente y su eliminación mediante Bio-Beads puede reducir algo la actividad, quizá como consecuencia de una pérdida parcial de lípidos, como se comentará más adelante en la discusión de los resultados.

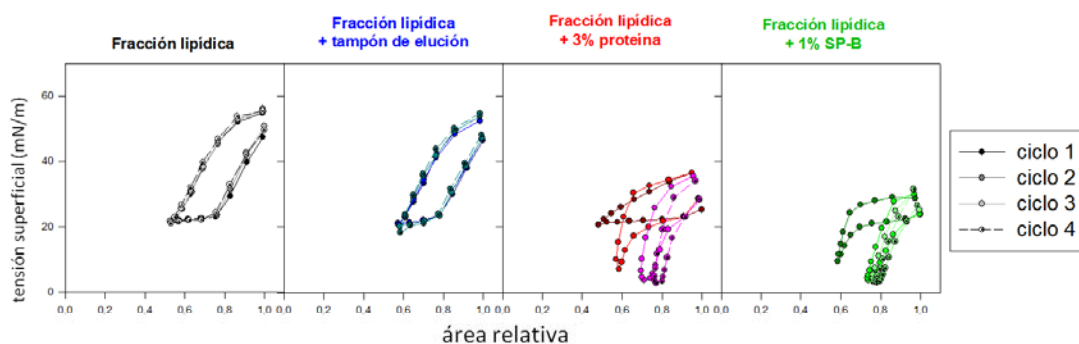
El comportamiento bajo compresión-expansión cuasiestática o dinámica de las muestras conteniendo los dos tipos de proteína resulta ser igualmente eficaz, alcanzando tensiones mínimas con tan sólo un 20% de compresión del área inicial, aunque en las muestras conteniendo la proteína purificada en detergente se necesitó llegar al ciclo cuasiestático 4 para alcanzar dichos valores, mientras que la SP-B procedente de solución orgánica lo consigue en el ciclo 2.

En resumen, la sustitución de la mezcla lipídica sintética por la fracción lipídica completa del surfactante mejoró notablemente el comportamiento de la proteína purificada en detergente en condiciones de compresión cuasiestática, que en la mezcla sintética resultó menos eficaz que la SP-B purificada en disolvente orgánico.

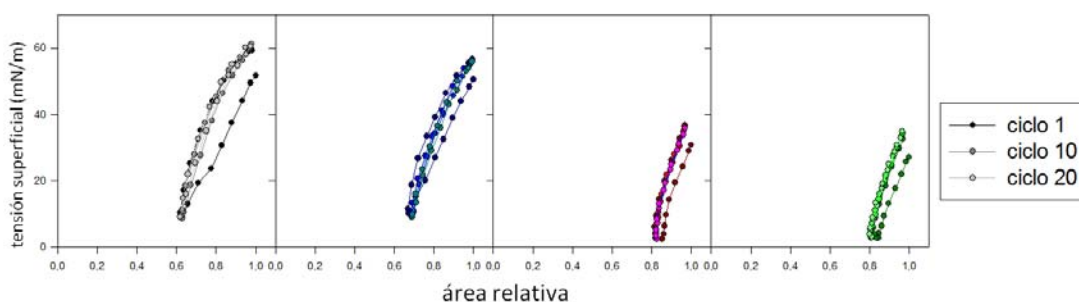
### A Cinéticas de adsorción interfacial de la proteína reconstituida en MLVs de fracción lipídica de surfactante



### B Ciclos cuasiestáticos



### C Ciclos dinámicos

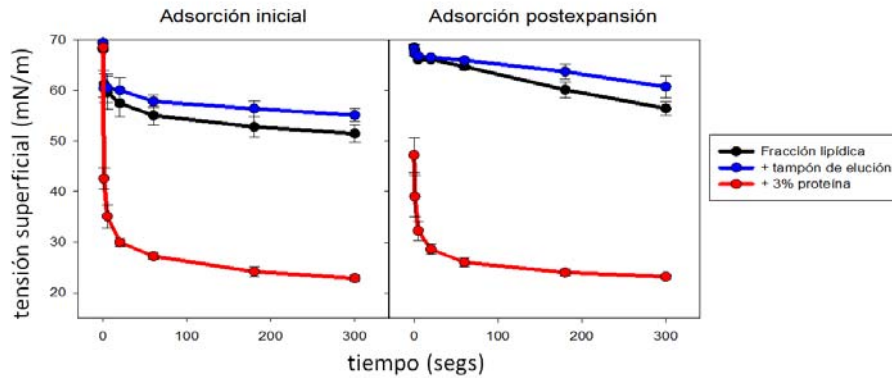


**Figura 69.** Estudio de la actividad en CBS de la proteína purificada en la columna de intercambio iónico reconstituida en suspensiones multilamelares de fracción lipídica de surfactante (en rojo). También se muestran los correspondientes controles de fracción lipídica pura (en negro) y fracción lipídica pre-tratada con tampón de elución con CHAPS (en azul). Se comparó además esta proteína con SP-B purificada en disolvente orgánico reconstituida de la misma manera con la fracción lipídica (en verde). En **A** se muestran la adsorción inicial y post-expansión de las 4 muestras, representándose para cada una de ellas la media de 3 repeticiones diferentes. En **B** y **C** se muestran experimentos representativos del comportamiento de las muestras sometidas a ciclos de compresión-expansión cuasiestáticos y dinámicos.

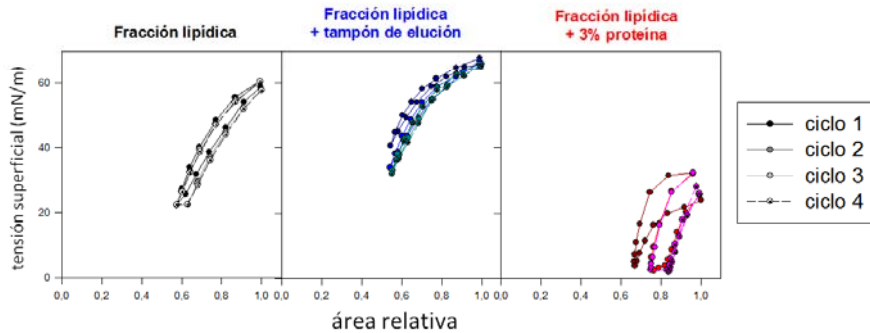
## Análisis de la actividad de la proteína purificada en detergente incorporada a LUVs de fracción lipídica de surfactante

En la figura 70 se analiza la actividad de la proteína purificada en detergente e incorporada a LUVs preformadas con la fracción lipídica de surfactante.

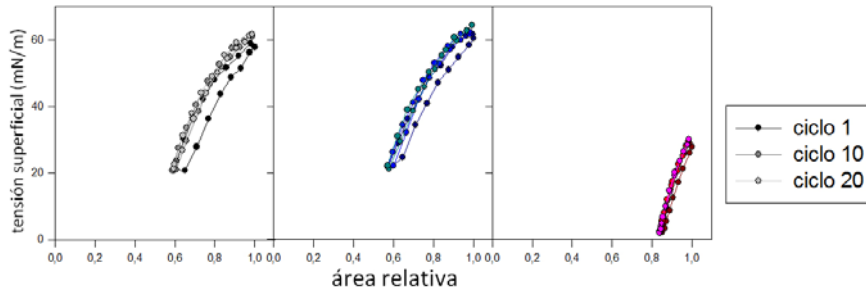
### A Cinéticas de adsorción interfacial de proteína incorporada a LUVs de fracción lipídica de surfactante



### B Ciclos cuasiestáticos



### C Ciclos dinámicos



**Figura 70.** Análisis de actividad mediante CBS de la proteína purificada con la columna de intercambio iónico incorporada a vesículas unilamelares de fracción lipídica de surfactante (en rojo) y sus correspondientes controles de fracción lipídica (en negro) y fracción lipídica pre-expuesta al tampón de elución (en azul). En **A** se muestran la adsorción inicial y post-expansión de las 3 muestras, representándose para cada una de ellas la media de 3 repeticiones diferentes. En **B** y **C** se muestran experimentos representativos del comportamiento de las muestras sometidas a ciclos de compresión-expansión cuasiestáticos y dinámicos.

Las LUVs de fracción lipídica libre de proteínas presentan peor actividad que las MLVs tanto en adsorción interfacial como en los ciclos cuasiestáticos y dinámicos, teniendo estas suspensiones un comportamiento más parecido al de la mezcla sintética DPPC/POPC/POPG que al de las suspensiones multivesiculares de lípidos del surfactante.

Sin embargo, las LUVs de fracción lipídica y proteína presentan una buena actividad, similar a la obtenida con la reconstitución de la proteína aislada en detergente o de la SP-B purificada en disolvente orgánico, en MLVs. El lípido en presencia de proteína es capaz de absorberse de manera eficaz alcanzando valores de tensión de equilibrio de 23 mN/m muy rápidamente. Durante los ciclos cuasiestáticos las preparaciones son capaces de alcanzar la tensión superficial mínima desde el ciclo 1, consiguiendo alcanzarla en el ciclo 4 con tan sólo un 19% de reducción de área, y manteniendo bajas tensiones superficiales máximas. En los ciclos dinámicos el comportamiento de la proteína es óptimo, con una ausencia total de histéresis y alcanzando la tensión mínima en el último ciclo con una reducción de área de tan sólo el 17%.

La reconstitución de la proteína en forma de LUVs por lo tanto, produce una menor funcionalidad respecto a las MLVs en membranas preparadas con la mezcla sintética de fosfolípidos, pero no cuando se reconstituye en la fracción lipídica completa del surfactante, a pesar del efecto parcialmente negativo que la formación de LUVs tiene sobre la actividad de los lípidos de surfactante observada en los controles.

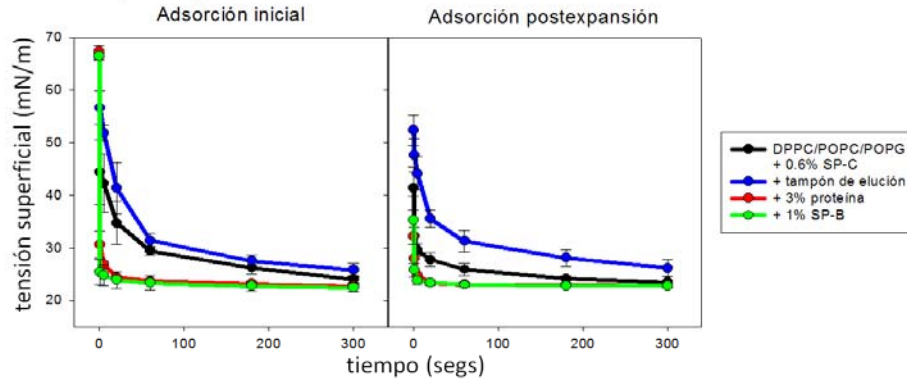
### **Análisis de la actividad de la proteína purificada en detergente en MLVs de una mezcla lipídica sintética en presencia de SP-C**

Para conocer el efecto de la presencia de la proteína hidrofóbica SP-C en la actividad de la proteína purificada en detergente, se prepararon MLVs con la mezcla lipoproteica DPPC/POPC/POPG (50:25:15) (p/p/p) conteniendo 0.6% (en peso) de SP-C, en ausencia o presencia de proteína purificada en detergente (3%) o en disolvente orgánico (1%).

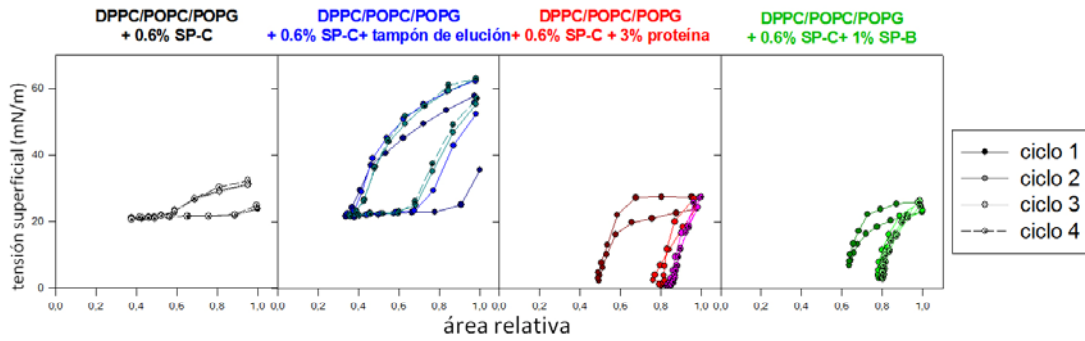
Los resultados de la figura 71 muestran una mejora sustancial en el comportamiento tensioactivo de los controles en ausencia de SP-B debido a la presencia de SP-C. Las muestras lipídicas conteniendo SP-C se adsorben a tensiones de equilibrio de 23 mN/m, aunque las cinéticas son más lentas que en presencia de SP-B. Durante los ciclos cuasiestáticos el lípido con SP-C no consigue llegar a tensiones superficiales mínimas, aunque mantiene tensiones máximas no muy elevadas tras la expansión, consecuencia de la adsorción promovida por la SP-C, mientras que en los ciclos dinámicos la presencia de la SP-C permite alcanzar la tensión mínima con un 23% de compresión del área en el ciclo 20. Al igual que se observó anteriormente, la exposición al tampón de elución conteniendo CHAPS produce una pérdida de actividad con respecto al control de lípido con SP-C no tratado con el tampón de elución, generando una adsorción algo más lenta, presiones máximas muy elevadas tanto en los ciclos

cuasiestáticos como dinámicos, y un requerimiento de mayor reducción de área para alcanzar la tensión superficial mínima en los ciclos dinámicos.

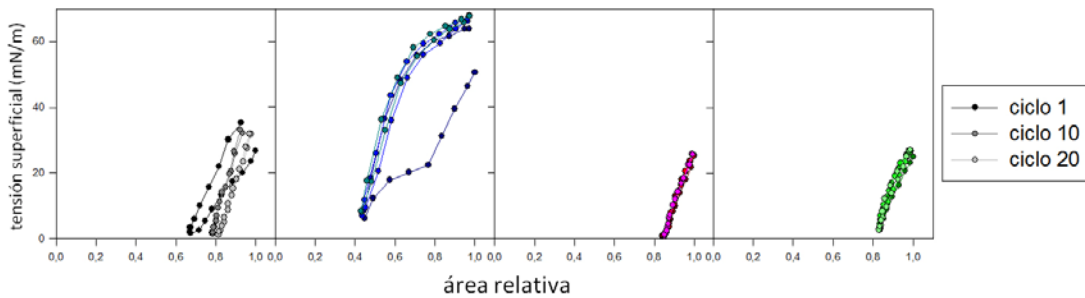
**A Cinéticas de adsorción interfacial de la proteína reconstituida en MLVs de la mezcla lipídica sintética DPPC/POPC/POPG con SP-C**



**B Ciclos cuasiestáticos**



**C Ciclos dinámicos**



**Figura 71.** Estudio funcional mediante CBS de la proteína purificada con la columna de intercambio iónico reconstituida en suspensiones multilamelares de DPPC/POPC/POPG conteniendo SP-C (en rojo). Se incluyen los correspondientes controles de lípido con SP-C (en negro) y lípido con SP-C pre-expuesto al tampón de elución (en azul). Se comparó además el efecto de esta proteína con el de SP-B purificada en disolvente orgánico reconstituida de la misma manera con el lípido y SP-C (en verde). En **A** se muestran la adsorción inicial y post-expansión de las 4 muestras, representándose para cada una de ellas la media de 3 repeticiones diferentes. En **B** y **C** se muestran experimentos representativos del comportamiento de las muestras sometidas a ciclos de compresión-expansión cuasiestáticos y dinámicos.

En cuanto al efecto de la SP-C en las preparaciones con proteína, se observa un aumento en la funcionalidad, tanto en las preparaciones con la proteína purificada en detergente como en las reconstituidas con la SP-B obtenida en disolvente orgánico. De esta manera la proteína muestra una adsorción muy eficaz, ciclos cuasiestáticos que alcanzan la tensión superficial mínima desde el primer ciclo y una compresión del área de tan sólo un 21% en el ciclo 4, y ciclos dinámicos sin histéresis que alcanzan la tensión mínima con una compresión del área del 20%.

Estas preparaciones conteniendo SP-B y SP-C muestran en términos generales un comportamiento tensioactivo comparable al del surfactante nativo entero.

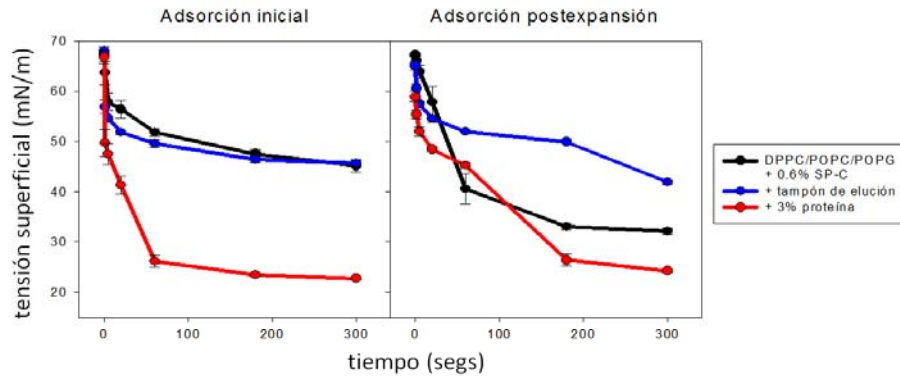
#### **Análisis de la actividad de la proteína purificada en detergente incorporada a LUVs de DPPC/POPC/POPG conteniendo SP-C**

El análisis de la actividad interfacial de muestras en las que se ha incorporado la proteína a LUVs de la mezcla lipídica sintética conteniendo SP-C se muestra en la figura 72. Al igual que ocurría en las muestras de lípidos en ausencia de SP-C, la formación de LUVs en lugar de MLVs produce una menor actividad de los controles. Las LUVs muestran menor capacidad de adsorción, también en presencia de SP-C, que las MLVs, así como mayores tensiones máximas e histéresis en los ciclos cuasiestáticos, y un peor comportamiento general en los ciclos dinámicos.

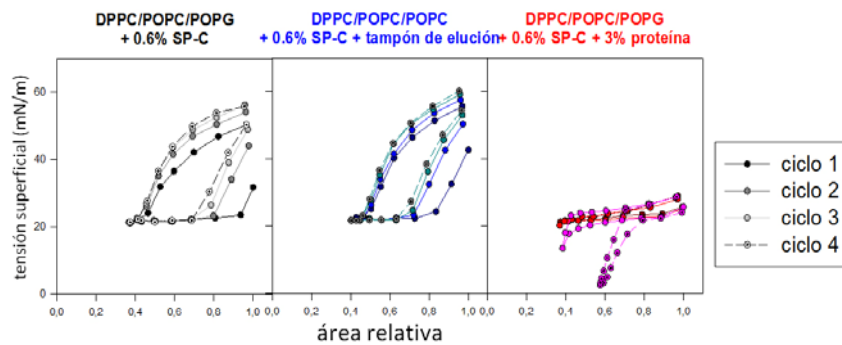
La adición de la proteína purificada en la columna de intercambio iónico a los complejos lípido/SP-C preformados, mejora notablemente su capacidad de adsorción pero sin llegar a la de las muestras de proteína reconstituida en MLVs. La proteína también mejora el comportamiento de las películas formadas por las LUVs cuando se someten a compresión-expansión cuasiestática, aunque solo alcanzan la tensión mínima en el ciclo 4, necesitando para ello un mayor porcentaje de reducción de área (48%) que en las películas formadas a partir de MLVs. Por último, estas películas formadas a partir de LUVs en presencia de SP-C presentan un comportamiento casi óptimo en condiciones de compresión-expansión dinámica, aunque las isothermas muestran una tensión máxima ligeramente mayor y algo mayor porcentaje de compresión para alcanzar la tensión mínima que lo observado en películas preparadas a partir de MLVs de la misma composición.



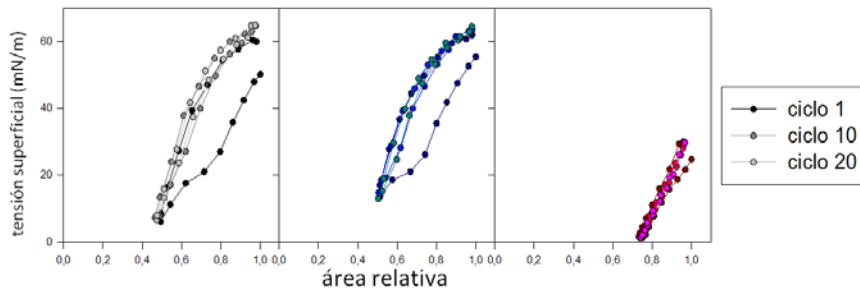
**A Cinéticas de adsorción interfacial de la proteína incorporada a LUVs de la mezcla lipídica sintética DPPC/POPC/POPG con SP-C**



**B Ciclos cuasiestáticos**



**C Ciclos dinámicos**

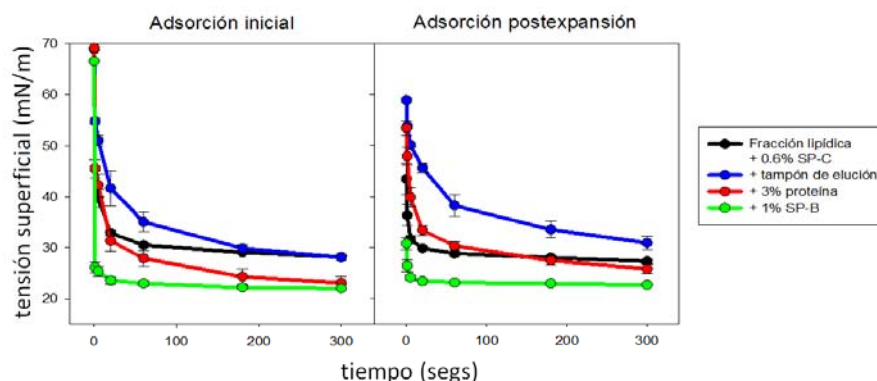


**Figura 72.** Estudio de la actividad mediante CBS de la proteína purificada en la columna de intercambio iónico incorporada a vesículas unilamelares de DPPC/POPC/POPG (50:25:10) conteniendo 0.6% (en peso) de SP-C (en rojo) y los correspondientes controles de lípido con SP-C (en negro) y lípido con SP-C pre-expuesto a tampón de elución con CHAPS (en azul). En **A** se muestran la adsorción inicial y post-expansión de las 3 muestras, representándose para cada una de ellas la media de 3 repeticiones diferentes. En **B** y **C** se muestran experimentos representativos del comportamiento de las muestras sometidas a ciclos de compresión-expansión cuasiestáticos y dinámicos.

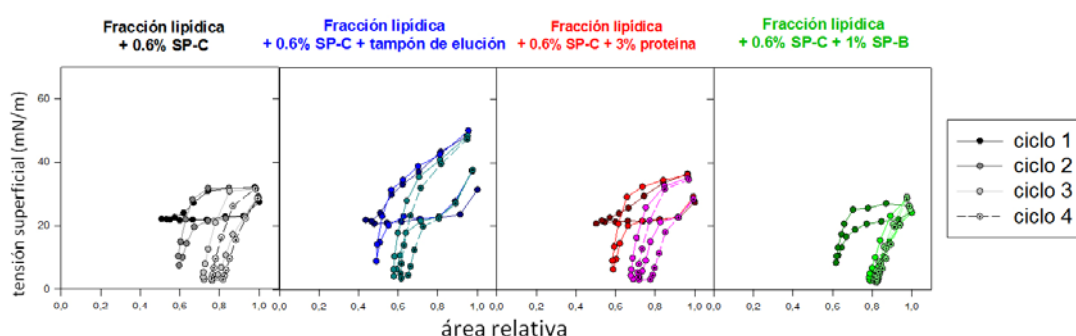
**Análisis de la actividad de la proteína purificada en detergente reconstituida en MLVs de la fracción lipídica de surfactante con SP-C**

En la figura 73 se muestra el análisis de la actividad interfacial de películas formadas a partir de MLVs de fracción lipídica del surfactante suplementada con SP-C (0.6% en peso), en ausencia o presencia de la proteína purificada en detergente.

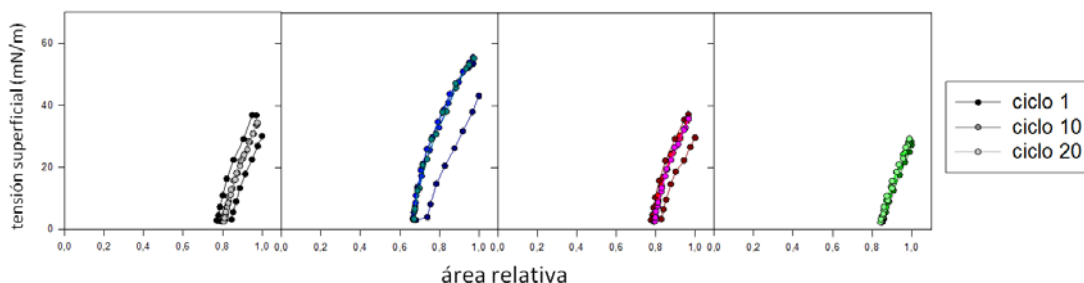
### A Cinéticas de adsorción interfacial de la proteína reconstituida en MLVs de fracción lipídica de surfactante con SP-C



### B Ciclos cuasiestáticos



### C Ciclos dinámicos



**Figura 73.** Estudio de la actividad mediante CBS de la proteína purificada en la columna de intercambio iónico reconstituida en suspensiones multilamelares de fracción lipídica de surfactante con SP-C (en rojo) y los correspondientes controles de fracción lipídica con SP-C (en negro) y fracción lipídica con SP-C pre-expuesta a tampón de elución con CHAPS (en azul). Se comparó además esta proteína con SP-B purificada en disolvente orgánico reconstituida de la misma manera con la fracción lipídica y SP-C (en verde). En **A** se muestran la adsorción inicial y post-expansión de las 4 muestras, representándose para cada una de ellas la media de 3 repeticiones diferentes. En **B** y **C** se muestran experimentos representativos del comportamiento de las muestras sometidas a ciclos de compresión-expansión cuasiestáticos y dinámicos.

La presencia de SP-C permite la adsorción del lípido aún en ausencia de SP-B, aunque sin llegar a los valores mínimos de tensión superficial de las muestras que contienen la proteína aislada en detergente o la SP-B purificada en disolvente orgánico. Además, una vez sometidas a compresión-expansión cuasiestática o dinámica, las películas de fracción lipídica y SP-C tienen un comportamiento equiparable al que

posee la fracción lipídica con cualquiera de las otras dos proteínas. De nuevo, el control pre-expuesto al tampón de elución con detergente presentó peor funcionamiento en todos los parámetros estudiados respecto al control que no contiene trazas de detergente.

En términos generales, las suspensiones de fracción lipídica con SP-C presentaron mejores actividades interfaciales que las suspensiones de la mezcla lipídica sintética, en ausencia o presencia de cualquiera de las preparaciones de SP-B.

La comparación de las muestras con proteína purificada en detergente y la SP-B obtenida en disolvente orgánico, revela un comportamiento prácticamente comparable, aunque la preparación que contiene SP-B aislada en disolvente presentó cinéticas de adsorción algo más rápidas, y requirió una ligeramente menor reducción de área para alcanzar la tensión superficial mínima durante los primeros ciclos cuasiestáticos. Por otro lado se puede observar que la presencia de SP-C no supone una mejora sustancial de la actividad de la SP-B, que ya era prácticamente inmejorable cuando la proteína era reconstituida con fracción lipídica sólo, y que la utilización de la fracción lipídica en lugar de la mezcla sintética, tampoco produce un mejor funcionamiento de la SP-B si la SP-C está presente, a diferencia de lo que ocurría cuando esta última no se incluía en la preparación.

En resumen los resultados obtenidos indican un efecto positivo de la inclusión de SP-C en la actividad de la fracción lipídica de surfactante en comparación con la de la mezcla lipídica sintética, y que la potenciación de la función tensioactiva de la proteína purificada en detergente o de la SP-B en disolvente, producida por la presencia de la SP-C o por la sustitución del lípido sintético por fracción lipídica del surfactante, no parece aditiva cuando las proteínas se encuentran en presencia de ambos potenciadores.

#### **Análisis de la actividad de la proteína purificada en detergente incorporada a LUVs de fracción lipídica de surfactante conteniendo SP-C**

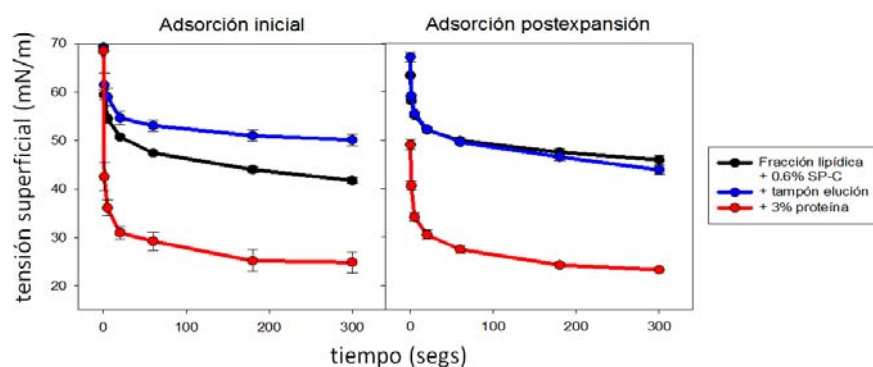
Por último se realizó un estudio de la actividad de muestras en las que la proteína purificada en detergente era añadida a LUVs de la fracción lipídica de surfactante y SP-C (0.6% p/p). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 74.

Como se ha visto en los experimentos anteriores, la reconstitución en forma de LUVs da lugar a muestras de lípido con SP-C que tienen peor comportamiento interfacial que las correspondientes MLVs con la misma composición. No obstante, la actividad de esta preparación es superior en ausencia de SP-B a la que se observó en LUVs de la mezcla lipídica sintética con SP-C, así como en LUVs de fracción lipídica de surfactante en ausencia de SP-C.

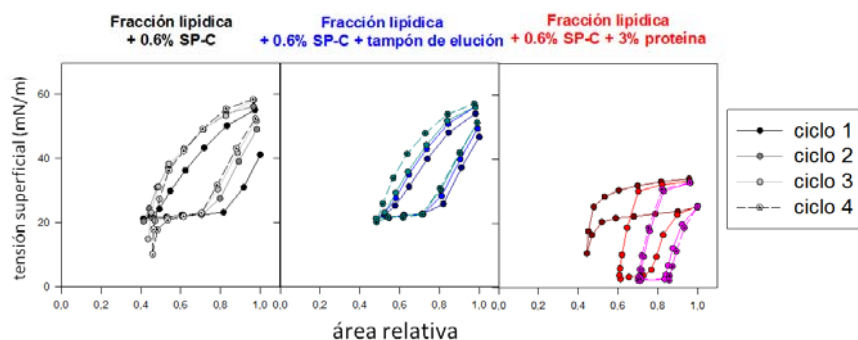
La adición de la SP-B purificada en detergente permite a estas preparaciones alcanzar un comportamiento tensioactivo óptimo. Esto incluye una rápida adsorción interfacial a tensiones de equilibrio de 23 mN/m, y tensiones superficiales mínimas

menores a 2 mN/m tanto en compresión cuasiestática como dinámica, con una reducción de área en torno al 20% y reducida histéresis. De nuevo, el comportamiento de estos sistemas es mejor que el de preparaciones similares que contienen la mezcla sintética simplificada en lugar de la fracción lipídica entera, pero algo peor que las muestras de la misma composición pero reconstituidas en forma de MLVs.

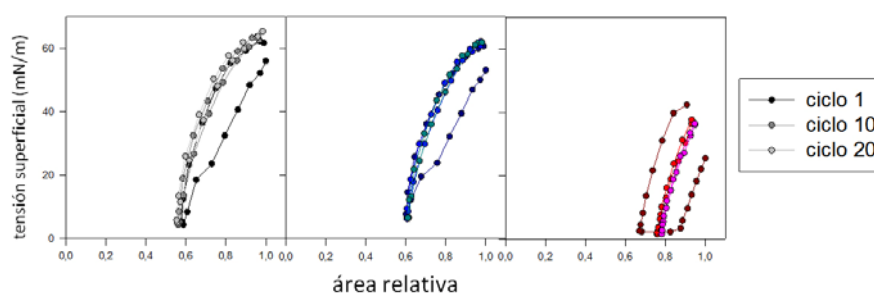
**A Cinéticas de adsorción interfacial de la proteína incorporada a LUVs de fracción lipídica de surfactante con SP-C**



**B Ciclos cuasiestáticos**



**C Ciclos dinámicos**



**Figura 74.** Estudio de actividad mediante CBS de la proteína purificada en la columna de intercambio iónico incorporada a vesículas unilamelares de fracción lipídica de surfactante con SP-C (en rojo) y sus correspondientes controles de fracción lipídica con SP-C (en negro) y fracción lipídica con SP-C pre-expuesta al tampón de elución con CHAPS (en azul). En A se muestran la adsorción inicial y post-expansión de las 3 muestras, representándose para cada una de ellas la media de 3 repeticiones diferentes. En B y C se muestran experimentos representativos del comportamiento de las muestras sometidas a ciclos de compresión-expansión cuasiestáticos y dinámicos.

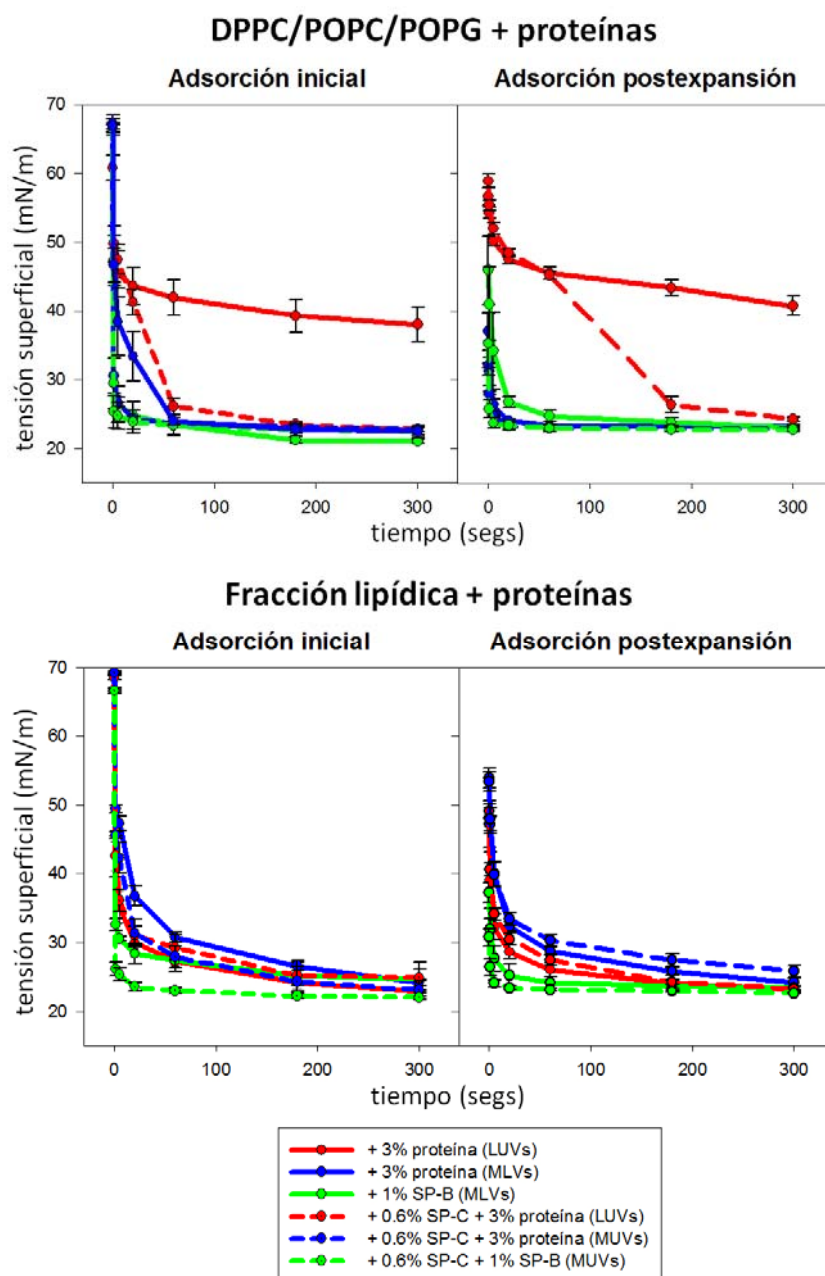
### **Resumen de los resultados obtenidos en los estudios funcionales de la proteína aislada en detergentes: efecto de la forma de reconstitución, de la mezcla lipídica utilizada y de la presencia de SP-C en el comportamiento tensioactivo de la proteína purificada con detergente**

En este apartado se resumen todos los resultados obtenidos con respecto a la actividad de la proteína purificada en detergente ensayada en el CBS, para evaluar los posibles efectos del método de reconstitución empleado, de la mezcla lipídica utilizada y de la presencia o ausencia de SP-C en el comportamiento tensioactivo de la proteína purificada en detergente. Para ello, en la figura **75** se comparan las cinéticas de adsorción inicial de todas las muestras ensayadas, agrupadas en dos gráficas que corresponden por un lado a las muestras preparadas a partir de la mezcla lipídica sintética y por otro a las preparadas con la fracción lipídica entera del surfactante. Además, en la **tabla 3** se reúnen y comparan los siguientes parámetros: la tensión superficial de equilibrio tras la adsorción inicial o post-expansión, la tensión superficial mínima y el porcentaje de reducción de área requerido para alcanzarla en los ciclos cuasiestáticos 1 y 4 y dinámicos 1 y 20, y la tensión superficial máxima tras la expansión de los ciclos cuasiestático 4 y dinámico 20.

#### ***Efecto en la adsorción interfacial de suspensiones lipídicas***

La comparación de la proteína purificada en detergente con la SP-B en disolvente orgánico, reconstituídas en la **mezcla sintética** en forma de **MLVs** (figura 75 superior) indica que ambas proteínas poseen una capacidad de adsorción similar y muy efectiva, por lo que la presencia de la SP-C en dichas preparaciones no ejerce un efecto apreciable. La reconstitución de la proteína mediante su incorporación a **LUVs** de lípido ya formadas, produce sin embargo una menor capacidad de adsorción (línea roja continua), efecto que se ve contrarrestado en parte por la presencia de **SP-C** en la preparación (línea roja discontinua).

Por otro lado en la gráfica inferior de la figura 75 se puede observar como la sustitución de la mezcla lipídica sintética por la **fracción lipídica** entera del surfactante hace que todas las muestras se agrupen en cinéticas de adsorción relativamente rápidas. La diferencia con respecto a las muestras con la mezcla sintética se hace más patente sobre todo cuando se comparan en forma de LUVs. Por otro lado la presencia de **SP-C** en la fracción lipídica mejora la adsorción de las MLVs, tanto en presencia de la proteína purificada en detergente como en presencia de la SP-B obtenida en disolvente orgánico (líneas discontinuas azul y verde), pero no en el caso de la proteína añadida a las LUVs (línea discontinua roja).

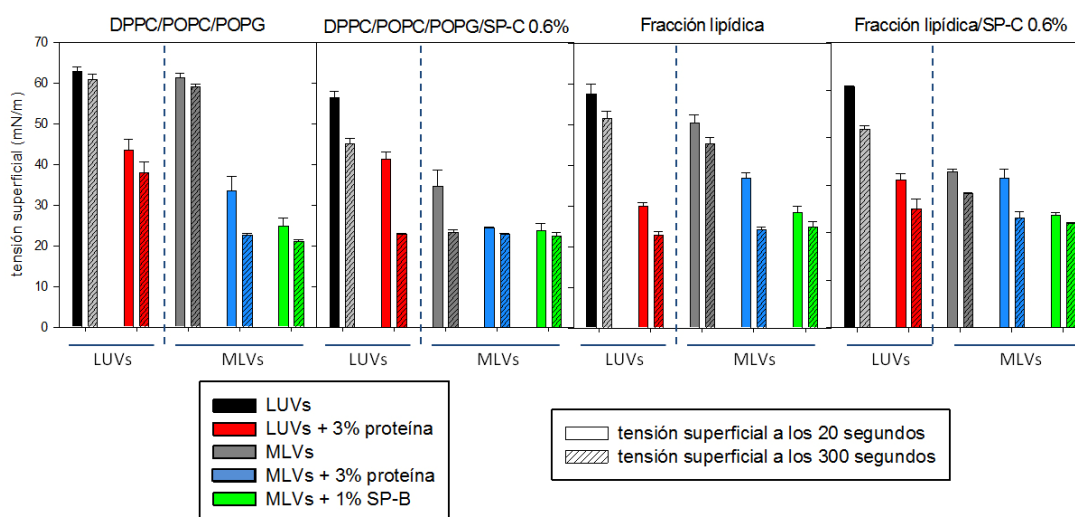


**Figura 75.** Comparación de las cinéticas de adsorción de las distintas preparaciones de vesículas unilamelares y multilamelares de DPPC/POPC/POPG o fracción lipídica de surfactante con o sin SP-C, con proteína purificada mediante la columna de intercambio iónico o con SP-B.

La comparación de las tensiones superficiales alcanzadas a los 20 segundos o 5 minutos tras la adsorción inicial permite realizar un análisis más detallado del efecto de la diferente composición lipoproteica y del método de reconstitución en la reducción de la tensión superficial (figura 76). En esta figura se confirma lo observado anteriormente: por un lado el método de reconstitución en forma de MLVs mejora en general la adsorción de los lípidos y proteínas, principalmente disminuyendo la tensión mínima en los tiempos cortos, y por otro lado la actividad de la proteína se ve favorecida por la

presencia de SP-C o de fracción lipídica de surfactante en las muestras reconstituidas en forma de LUVs.

Tensión superficial mínima durante la adsorción inicial



**Figura 76.** Comparación de la tensión superficial alcanzada por las diferentes preparaciones de lípidos y proteínas estudiadas, a los 20 y 300 segundos durante la adsorción inicial.

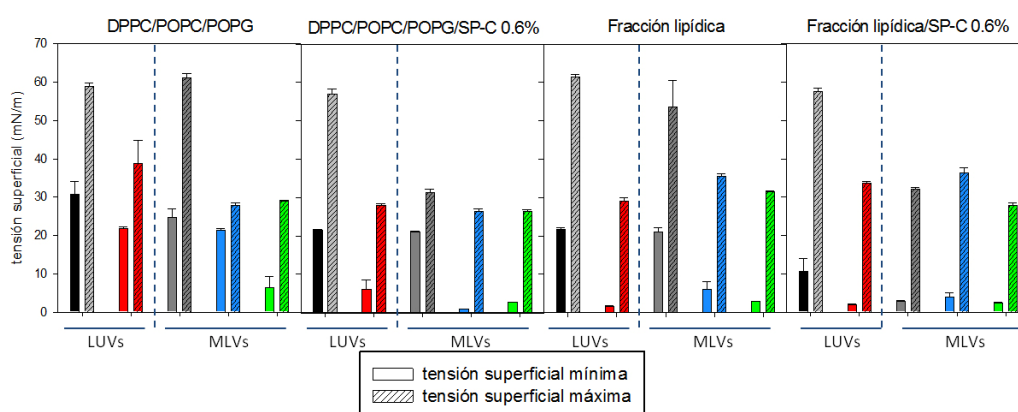
### *Efecto de la proteína en los ciclos cuasiestáticos y dinámicos*

Para facilitar el estudio del comportamiento de la proteína en las diferentes preparaciones durante los ciclos cuasiestáticos y dinámicos, se han representado los parámetros principales de la tabla 3 que describen ese comportamiento en forma gráfica. Los resultados referentes a los ciclos cuasiestáticos se representan en la figura 77A y C y los referentes a los ciclos dinámicos en la figura 77B y C.

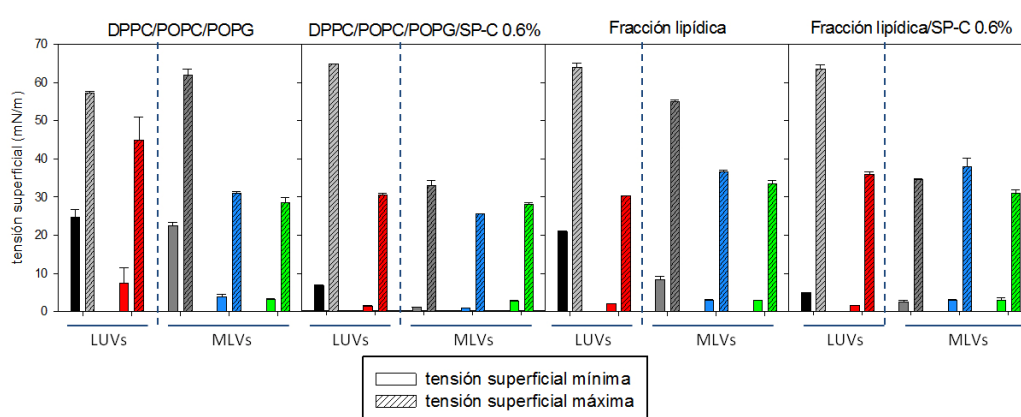
La sustitución de la **mezcla lipídica** sintética por fracción lipídica del surfactante en MLVs, supone una mejora sustancial del comportamiento de las muestras sometidas a compresión-expansión, observándose en forma de una claramente menor tensión mínima tras el ciclo cuasiestático 4 tanto en presencia de la proteína en detergente como de la SP-B en disolvente orgánico. Lo mismo ocurre con el porcentaje de área comprimida necesario para alcanzar la tensión mínima, que se ve sustancialmente reducido. El efecto sobre los ciclos dinámicos resulta menos evidente debido al buen funcionamiento en las mezclas lipídicas sintéticas en presencia de la proteína durante la compresión dinámica.



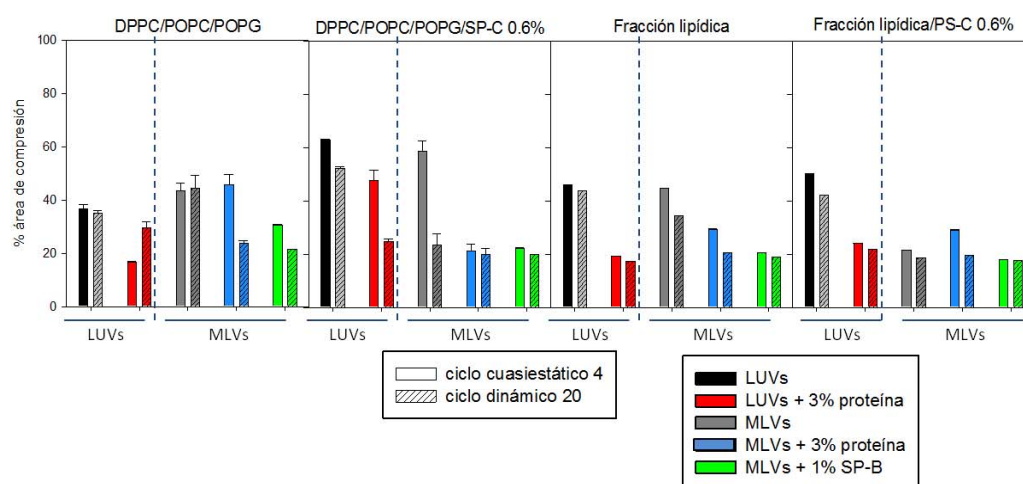
A) Tensión superficial mínima y máxima durante el ciclo cuasiestático 4



B) Tensión superficial mínima y máxima durante el ciclo dinámico 20



C) Porcentaje de reducción de área para alcanzar la tensión mínima durante los ciclos cuasiestático 4 y dinámico 20



**Figura 77. A.** Comparación de la tensión superficial mínima y máxima alcanzada por las diferentes preparaciones de lípidos y proteínas estudiadas, durante el ciclo cuasiestático 4. **B.** Comparación de la tensión superficial mínima y máxima alcanzada por las diferentes preparaciones de lípidos y proteínas estudiadas, durante el ciclo dinámico 20. **C.** Comparación del porcentaje de reducción de área necesario para alcanzar la tensión superficial mínima en los ciclos cuasiestático 4 y dinámico 20, por las diferentes preparaciones de lípidos y proteínas estudiadas.



Por otro lado, la incorporación de **SP-C** a la mezcla lipídica sintética en MLVs produce también una mejoría del comportamiento durante los ciclos, observándose una reducción en la tensión superficial mínima en los ciclos cuasiestáticos, así como una disminución en el porcentaje de área comprimida en dichos ciclos.

Finalmente, en lo referente al **método de reconstitución** se puede observar cómo la incorporación de la proteína a LUVs, en comparación a las MLVs, produce en el caso de la mezcla lipídica sintética sin SP-C una menor reducción de la tensión superficial máxima en el ciclo cuasiestático 4 y dinámico 20, probablemente como consecuencia de una adsorción más lenta de las LUVs comparada con las MLVs. Sin embargo en presencia de fracción lipídica se reducen estas diferencias.

|                            | $\gamma_{eq}$ (mN/m) |           | $\gamma_{min}$ (mN/m) - Area Compression (%) |            |          |           |          |           | $\gamma_{max}$ (mN/m) |           |
|----------------------------|----------------------|-----------|----------------------------------------------|------------|----------|-----------|----------|-----------|-----------------------|-----------|
|                            | IA                   | PEA       | $Q_i$                                        | $AC_i$     | $Q_d$    | $AC_d$    | $D_i$    | $AC_i$    | $D_{20}$              | $D_{20}$  |
| <b>PI (LUVs)</b>           | 60.9±1.3             | 59.1±1.7  | 35.5±4.9                                     | 37.8±0.6   | 30.7±3.4 | 36.7±1.7  | 24.3±2   | 34.9±0.9  | 24.8±1.9              | 35.2±0.9  |
| +tampón de elución         | 60.5±0.5             | 61.7±0.03 | 46.9±1.2                                     | 38.9±0.3   | 40.8±1.4 | 38.7±0.5  | 36.1±0.7 | 39.3±1.4  | 38.0±0.6              | 38.5±1.2  |
| +prot 3%                   | 38.0±2.5             | 40.8±1.4  | 22.3±0.2                                     | 26.8±0.7   | 21.9±0.3 | 16.7±0.2  | 5.5±2.5  | 28.2±0.5  | 7.5±4                 | 29.6±2.1  |
| <b>PI (MLVs)</b>           | 59.0±0.7             | 57.6±2.0  | 27.6±4.8                                     | 46.7±4.2   | 24.7±2.3 | 43.4±2.9  | 22.4±1.3 | 43.9±5.1  | 22.5±0.9              | 44.4±4.9  |
| +tampón de elución         | 59.1±2.3             | 62.3±0.6  | 35.1±1.8                                     | 36.8±0.8   | 32.8±1.4 | 36.2±0.6  | 31.0±0.9 | 34.7±0.02 | 31.3±0.8              | 34.9±0.3  |
| +prot 3%                   | 22.6±0.5             | 23.3±0.2  | 21.6±0.1                                     | 45.4±3.4   | 21.4±0.4 | 45.6±3.9  | 4.7±0.6  | 28.7±2.2  | 3.9±0.6               | 23.9±0.8  |
| +SPB 1%                    | 21.1±0.3             | 23.1±0.3  | 20.6±0.9                                     | 44.5±0.01  | 6.3±3.1  | 30.7±0.07 | 3.3±0.2  | 20.9±0.01 | 3.2±0.2               | 21.4±0.01 |
| <b>PI +0.6% SPC (LUVs)</b> | 45.2±1.3             | 32.2±0.5  | 21.2±0.1                                     | 60.1±1.5   | 21.5±0.1 | 62.7±0.6  | 6.7±0.7  | 51.0±0.3  | 6.8±0.3               | 52.1±0.6  |
| +tampón de elución         | 45.7±0.7             | 41.9±0.5  | 21.5±0.1                                     | 54.1±3.8   | 21.4±0.1 | 56.6±2.1  | 14.6±1.5 | 49.0±2.6  | 15.2±2.0              | 50.0±2.3  |
| +prot 3%                   | 22.8±0.3             | 24.3±0.3  | 21.7±0.3                                     | 60.5±1.2   | 6.0±2.5  | 47.8±3.9  | 1.7±0.2  | 24.6±1.4  | 1.5±0.1               | 24.9±0.7  |
| <b>PI +0.6% SPC (MLVs)</b> | 23.4±0.7             | 23.1±0.04 | 20.9±0.2                                     | 63.1±0.5   | 21.0±0.3 | 58.7±3.7  | 1.7±0.07 | 32.4±0.2  | 1.2±0.02              | 23.3±4.3  |
| +tampón de elución         | 25.8±1.2             | 26.2±1.5  | 21.2±0.2                                     | 63.3±1.2   | 21.0±0.6 | 65.6±1.5  | 9.8±3.6  | 57.6±2.5  | 8.8±0.9               | 57.9±1.2  |
| +prot 3%                   | 22.8±0.3             | 22.9±0.4  | 2.7±0.4                                      | 47.6±3.0   | 0.9±0.1  | 21.7±2.8  | 1.1±0.1  | 18.9±1.4  | 0.9±0.1               | 19.8±2.5  |
| +SPB 1%                    | 22.5±0.9             | 22.8±0.3  | 6.3±0.5                                      | 37.4±0.01  | 2.7±0.03 | 22.3±0.02 | 2.7±0.09 | 20.1±0.02 | 2.8±0.05              | 19.9±0.01 |
| <b>FI (LUVs)</b>           | 51.5±1.7             | 56.5±1.4  | 22.2±0.5                                     | 45.6±0.02  | 21.8±0.4 | 45.9±0.02 | 20.3±0.5 | 41.2±0.03 | 20.9±0.2              | 43.7±0.02 |
| +tampón de elución         | 54.2±1.6             | 58.7±1.4  | 24.4±1.7                                     | 45.5±0.01  | 23.0±0.4 | 44.8±0.01 | 21.8±0.2 | 42.7±0.01 | 21.7±0.4              | 43.0±0.01 |
| +prot 3%                   | 22.9±0.7             | 23.2±0.4  | 3.8±0.01                                     | 32.9±0.01  | 1.7±0.03 | 19.3±0.03 | 2.0±0.1  | 15.9±0.02 | 2.0±0.01              | 17.2±0.03 |
| <b>FI (MLVs)</b>           | 45.3±1.4             | 30.0±0.7  | 21.5±0.03                                    | 45.6±0.02  | 21.1±0.1 | 44.8±0.02 | 10.1±0.9 | 36.0±0.01 | 8.3±0.9               | 34.5±0.04 |
| +tampón de elución         | 47.0±0.9             | 43.8±0.4  | 21.1±0.1                                     | 45.7±0.01  | 13.3±2.9 | 41.6±0.01 | 9.1±0.6  | 34.2±0.01 | 8.0±0.6               | 33.0±0.02 |
| +prot 3%                   | 24.2±0.5             | 24.2±0.5  | 20.7±0.9                                     | 48.7±0.02  | 6.0±2.0  | 29.4±0.04 | 2.9±0.5  | 19.0±0.01 | 2.9±0.4               | 20.5±0.01 |
| +SPB 1%                    | 24.7±1.5             | 23.4±0.3  | 10.8±1.2                                     | 41.7±0.001 | 2.9±0.04 | 20.7±0.01 | 2.8±0.02 | 18.9±0.01 | 2.9±0.08              | 18.9±0.01 |
| <b>FI +0.6% SPC (LUVs)</b> | 41.8±0.7             | 46.0±0.9  | 21.5±0.1                                     | 55.5±0.02  | 10.7±3.2 | 50.2±0.02 | 4.5±0.4  | 39.3±0.02 | 5.0±0.1               | 42.1±0.02 |
| +tampón de elución         | 50.2±1.2             | 43.9±0.9  | 21.8±0.2                                     | 52.8±0.01  | 20.9±0.4 | 52.4±0.01 | 7.0±0.7  | 41.3±0.01 | 7.9±1.0               | 42.0±0.01 |
| +prot 3%                   | 24.9±2.2             | 23.3±0.2  | 10.3±0.6                                     | 52.9±0.02  | 1.9±0.3  | 24.2±0.04 | 1.9±0.1  | 17.2±0.02 | 1.6±0.02              | 21.9±0.02 |
| <b>FI +0.6% SPC (MLVs)</b> | 28.2±0.2             | 27.3±0.4  | 21.3±0.2                                     | 45.6±0.03  | 2.9±0.2  | 21.5±0.02 | 2.6±0.3  | 17.9±0.02 | 2.6±0.3               | 18.7±0.01 |
| +tampón de elución         | 28.1±0.7             | 30.9±1.3  | 16.4±4.2                                     | 56.4±0.02  | 3.3±0.4  | 43.5±0.03 | 3.2±0.2  | 37.0±0.03 | 3.0±0.5               | 35.8±0.02 |
| +prot 3%                   | 23.1±1.3             | 25.8±0.9  | 20.4±0.2                                     | 48.0±0.01  | 4.0±1.0  | 29.1±0.03 | 3.0±0.3  | 19.5±0.02 | 2.9±0.3               | 19.6±0.02 |
| +SPB 1%                    | 22.0±0.2             | 22.7±0.1  | 8.1±0.4                                      | 40.6±0.02  | 2.3±0.2  | 18.0±0.01 | 3.2±1.04 | 18.2±0.02 | 2.9±0.7               | 17.7±0.01 |

**Tabla 3.** Resumen de los parámetros más importantes del comportamiento en el CBS de las muestras estudiadas: DPPC/POPC/POPG (PL) o fracción lipídica de surfactante (FL) en forma de vesículas unilamelares (LUVs) o multilamelares (MLVs), con o sin SP-C, pre-expuestas o no al tampón de elución que contiene CHAPS, y con proteína purificada de la columna Hitrap o con SP-B. Se muestran la tensión superficial de equilibrio ( $\gamma_{eq}$ ) alcanzada durante la adsorción inicial (IA) o post-expansión (PEA). Respecto a los ciclos de compresión-expansión se muestra la tensión superficial mínima ( $\gamma_{min}$ ) y el porcentaje del área de compresión necesario para alcanzarla (AC) de los ciclos cuasiestáticos 1 y 4 (Q) y de los ciclos dinámicos 1 y 20 (D). Además se muestra la tensión superficial máxima ( $\gamma_{max}$ ) del ciclo cuasiestático 4 y dinámico 20. Los datos de la tabla son medias con desviaciones estándar ( $n = 3$ ).

### **5.2.8. Organización supramolecular de la proteína SP-B**

Una vez confirmado que la purificación optimizada en presencia de CHAPS permite obtener una preparación de SP-B con un comportamiento estructural y funcional enteramente comparable al de la SP-B obtenida mediante el método clásico de purificación en disolvente orgánico, se procedió al análisis de la organización supramolecular de la SP-B en CHAPS.

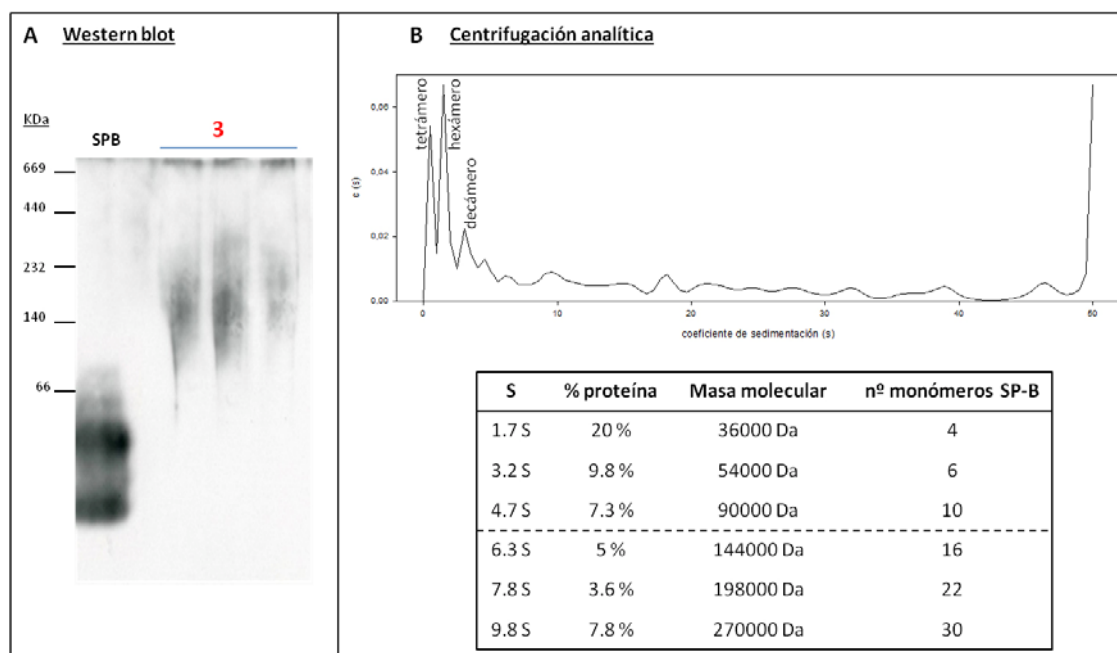
Es de esperar que el mantenimiento durante todo el proceso de purificación de concentraciones de detergente alrededor de la cmc haya preservado los complejos proteicos de SP-B en una forma soluble, que a continuación fue caracterizada mediante electroforesis nativa, centrifugación analítica y microscopía electrónica.

#### ***5.2.8.1. Estudio del grado de oligomerización mediante electroforesis nativa y centrifugación analítica***

El estudio electroforético en condiciones desnaturalizantes de la proteína retenida en la columna de intercambio iónico, reveló la ausencia de bandas de masa molecular por encima de 32 kDa. No obstante, podría ocurrir que la proteína nativa estuviera formando algún tipo de oligómero susceptible a la disociación por un detergente iónico fuerte, como es el SDS, durante la electroforesis. Para estudiar la presencia de complejos proteicos de elevada masa molecular en la proteína nativa purificada en CHAPS, se realizó una electroforesis nativa “Blue Native” cuyo resultado se muestra en la figura **78A**. Esta técnica elude el uso de agentes desnaturalizantes o reductores. Como se observa en la inmunodetección, se encontró una banda ancha no muy bien definida de SP-B entre los 140-230 kDa, que no apareció en el caso de la SP-B purificada en disolvente orgánico. Los Western blots realizados con anticuerpos anti SP-A y anti SP-C proporcionaron resultados negativos, mostrando membranas completamente blancas sin ningún tipo de banda a elevadas masas moleculares. Por lo tanto, el resultado de la electroforesis nativa confirma la existencia de complejos proteicos de elevado tamaño en el surfactante, conteniendo SP-B y cuya organización supramolecular es alterada durante el proceso de extracción y purificación de la proteína en disolventes orgánicos.

En la figura **78B** se muestra el resultado de un experimento de velocidad de sedimentación mediante centrifugación analítica de los complejos proteicos purificados en detergente. La masa molecular relativa de las partículas presentes en los diferentes picos se calculó en función del coeficiente de sedimentación. Considerando que la muestra se compone principalmente de SP-B, y teniendo en cuenta una masa molecular del monómero de 9 kDa, los picos principales que aparecieron en la muestra corresponderían a tetrámeros y hexámeros de SP-B, y en menor medida decámeros. También aparecieron picos de partículas de mayores tamaños moleculares que corresponderían a formas más oligomerizadas, pero al poseer coeficientes de sedimentación superiores a 6 S existe la posibilidad de que se trate de formas de la proteína agregadas inespecíficamente.

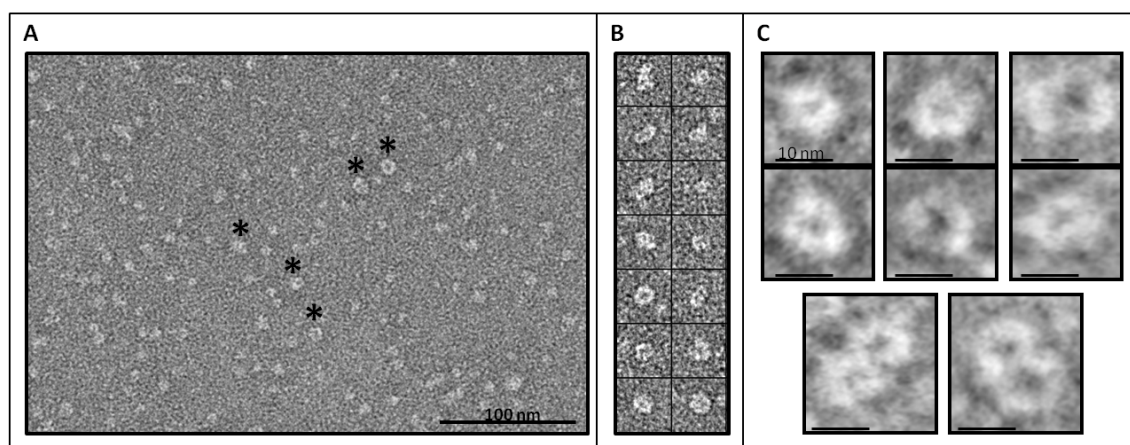
En definitiva, los resultados obtenidos mediante centrifugación analítica junto con la electroforesis en condiciones nativas, respaldan la existencia de complejos proteicos altamente oligomerizados en la fracción proteica cargada positivamente retenida en la columna de intercambio iónico, y constituida principalmente por SP-B y minoritariamente por SP-C, aunque todavía no ha sido posible determinar el tamaño molecular concreto de dichos complejos.



**Figura 78.** Estudio del estado nativo de las proteínas retenidas en la columna de intercambio iónico Hitrap SP (pico 3). En **A** se muestra un Western blot anti SP-B de un gel en gradiente de 5-20% acrilamida, en condiciones nativas (electroforesis “Blue Native”), en el que se cargaron fracciones del pico 3 de tres purificaciones distintas, y SP-B purificada en disolvente orgánico como control. Las masas moleculares indicadas son sólo aproximadas ya que la electroforesis se desarrolló en ausencia de SDS. En **B** se muestran los resultados de un experimento de velocidad de sedimentación mediante centrifugación analítica. La línea discontinua de la tabla indica que por debajo de ella los oligómeros de proteína pueden ser debidos a agregación inespecífica.

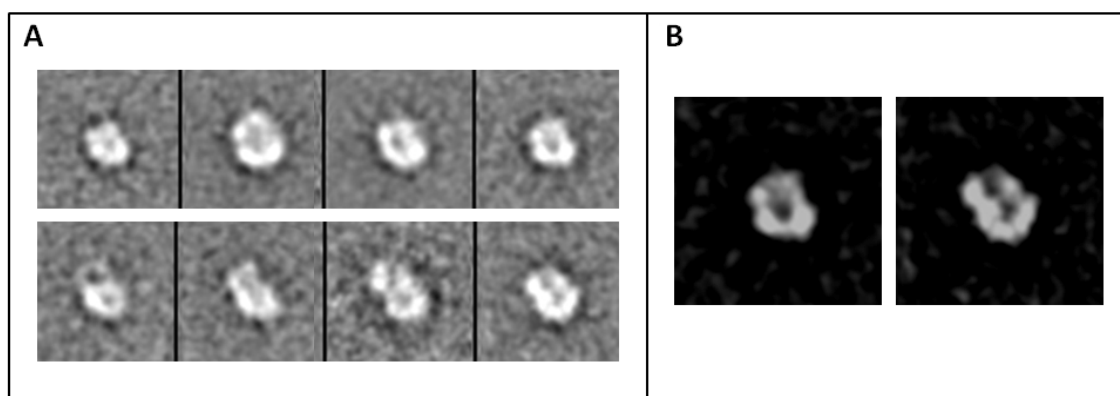
#### 5.2.8.2. Estudio estructural mediante microscopía electrónica de transmisión

En base a los experimentos anteriores, y teniendo en cuenta los elevados tamaños moleculares de los complejos proteicos purificados en detergente, éstos se tiñeron negativamente y se observaron en el microscopio electrónico (figura 79A), con el fin de estudiar si dichos complejos podrían ser visualizados con esta técnica y si poseían algún tipo de estructura definida que confirmara que no constituyen una mera agregación inespecífica.



**Figura 79.** Imágenes de microscopía electrónica de una fracción del pico de proteína retenida en la columna de intercambio iónico. Como se puede observar en **A**, la muestra contiene una gran concentración de partículas de tamaño y forma homogéneos, como los señalados por los asteriscos. En **B** se muestran algunas de estas partículas, y en **C**, más en detalle, se observa claramente su forma anular y la aparición en ocasiones de formas conectadas de 2 anillos.

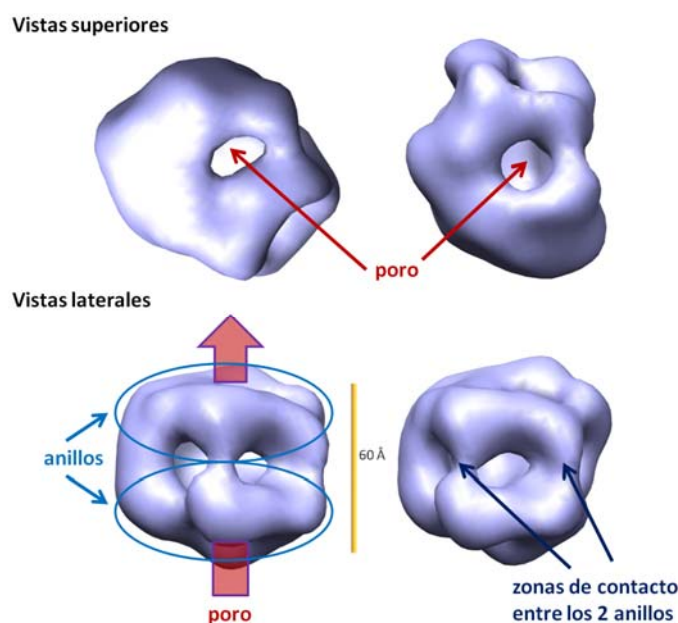
A partir de las micrografías se extrajeron 10305 imágenes de partículas individuales (figura **79B** y **C**) que se analizaron en dos dimensiones utilizando algoritmos de clasificación libres de patrón. Las imágenes medias obtenidas (figura **80**) poseen características muy definidas, presentando una estructura circular con un poro central, en forma de uno o dos anillos. Entre estas medias podían diferenciarse principalmente dos tipos de vistas: una posible vista frontal de forma globular con una cavidad central (figura **80B** izquierda) y una vista lateral formada por dos anillos (figura **80B** derecha) en la que ambos parecen compartir alguna de las subunidades por las que conectan. Debido a la baja resolución que es posible alcanzar a través de la técnica de microscopía electrónica de tinción negativa no podemos discernir el número de subunidades que podrían formar cada uno de los anillos, aunque parece estar formado por 5 o 6 subunidades.



**Figura 80.** Medias en 2D libres de referencia, generadas a partir de la clasificación de las partículas por su forma. En **B** se muestran los dos tipos de partículas visualmente diferentes.

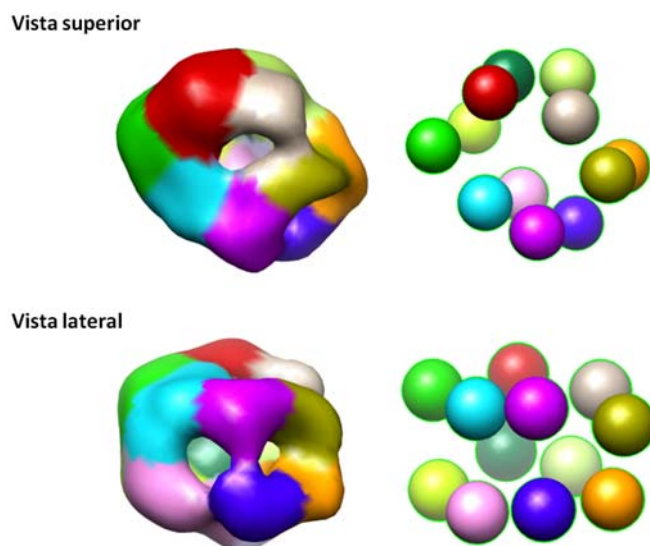
Las 10305 partículas correspondientes a moléculas individuales del oligómero de SP-B se utilizaron en un proceso de refinamiento angular iterativo. La diversidad de imágenes de proyección presentes en el conjunto inicial de partículas permitió obtener un volumen preliminar a una resolución de 25 Å (figura 81). En las vistas frontales se aprecia la existencia de un poro central alrededor del cual se disponen subunidades de proteína, observándose una cierta asimetría a ambos lados del eje central. Por otro lado, las vistas laterales muestran sin embargo una simetría más clara como una posible consecuencia de la superposición de dos anillos, uno encima del otro. Las cavidades que se observan en las vistas laterales se deberían a las zonas en las que no existen contactos entre los dos anillos superior e inferior.

Teniendo en cuenta el volumen obtenido anteriormente, proponemos un modelo en el cual las subunidades que constituyen el complejo alrededor del poro podrían diferenciarse unas de otras por su mayor densidad, estando separadas entre sí por zonas de menor densidad. De este modo, como se muestra en la figura 82, el modelo estaría formado por 6 densidades de diferentes colores que constituyen las 6 posibles subunidades de cada anillo.



**Figura 81.** Volumen tridimensional de las partículas de SP-B, proyectado a partir de los promedios de las imágenes bidimensionales.





**Figura 82.** Volumen tridimensional de las partículas de SP-B, con las distintas subunidades que lo forman diferenciadas en colores. Al lado se han representado las zonas de mayor densidad con un modelo de esferas para mostrar la disposición espacial de las posibles subunidades.

En resumen, el volumen preliminar resuelto mediante microscopía electrónica de las muestras teñidas negativamente, permite definir a priori, la organización general del oligómero de SP-B. Este complejo se organiza en una forma definida circular en torno a un poro central, y podría estar constituido por dos anillos superpuestos, cada uno de los cuales estaría formado por 6 subunidades proteicas.

### 5.3. DISCUSIÓN

El surfactante pulmonar está constituido mayoritariamente por lípidos, que suponen aproximadamente el 90% de su peso, mientras que las proteínas hidrofóbicas SP-B y SP-C, necesarias para su función tensioactiva, sólo constituyen en torno al 2% (Goerke, 1998). Como en el caso de otras proteínas de membrana, las proteínas hidrofóbicas del surfactante, tradicionalmente purificadas mediante el empleo de disolventes orgánicos, pueden ser obtenidas de manera menos agresiva y desnaturizante a través de su solubilización con detergentes, permitiendo el mantenimiento de las estructuras proteicas en solución gracias a la mimetización del ambiente lipídico nativo. De esta forma, la obtención de proteínas funcionales mediante solubilización del sistema lipoproteico, en este caso el surfactante pulmonar, requiere la utilización de detergentes no desnaturizantes, en general detergentes no iónicos, en una cantidad suficiente para obtener las proteínas separadas del entorno lipídico, pero sin alterar las interacciones proteína-proteína que podrían intervenir en la organización macromolecular de la proteína (Silvius, 1992; Prive, 2007).

El estudio llevado a cabo en la presente Tesis mediante la solubilización del surfactante pulmonar con detergentes, persigue en este sentido dos objetivos: por un

lado estudiar los potenciales complejos formados por las proteínas del surfactante en su forma nativa sin alterar las interacciones entre ellas, y por otro obtener y caracterizar estructural y funcionalmente complejos supradiméricos de SP-B cuya existencia, predicha por el modelo estructural descrito en el capítulo 1 de esta Tesis, podría haber pasado desapercibida hasta el momento debido a su desorganización por el uso de los disolventes orgánicos.

**El surfactante solubilizado con detergentes no desnaturalizantes contiene complejos proteicos constituidos por las proteínas del surfactante en distintos grados de oligomerización**

Para llevar a cabo el primer objetivo se estudió la separación de complejos proteicos del surfactante mediante solubilización con 3 detergentes con diferentes características físico-químicas, todos ampliamente empleados en la purificación de proteínas de membrana debido a sus propiedades de solubilización suaves. El detergente no iónico **dodecilmaltósido** posee una concentración micelar crítica de aproximadamente 0.15 mM, es decir, que a partir de esta concentración de detergente tiene lugar la aparición de las micelas y por tanto comienza el proceso de solubilización. Como se ha explicado en la introducción, la solubilización de los sistemas lipídicos es altamente dependiente de la concentración de lípido inicial existente en la muestra, por lo que es importante tener en cuenta la relación detergente/lípido. En el caso del dodecilmaltósido, se ha encontrado que dicha relación molar es de 2.23 para liposomas de fosfatidilcolina, y que este detergente tiene una mayor capacidad de solubilización de membranas de dicho lípido que otros detergentes no iónicos, como el octilglucósido o el Triton X100 (de la Maza y Parra, 1997). La relación molar DDM/lípido utilizada en los experimentos de esta Tesis ha sido de 2.9, por lo que puede suponerse que ha tenido lugar una solubilización correcta del surfactante, tal y como se observa además mediante seguimiento de la dispersión de luz en la muestra. También se ha utilizado otro detergente no iónico, la **digitonina**, empleado previamente con éxito para la solubilización de proteínas de membrana (Krause, 2006). Al igual que en el caso anterior la elección de la relación detergente/lípido se basó en las medidas de turbidez en el proceso de solubilización.

Por último se utilizó también el detergente zwitteriónico **CHAPS**, que es un derivado del ácido cólico ampliamente utilizado para la solubilización de proteínas de membrana, debido a su carácter no desnaturalizante, por no presentar carga neta, poseer una estructura rígida que interacciona en menor grado con la proteína, y presentar una baja absorción en el ultravioleta. Este detergente presenta la ventaja de poseer una cmc mayor que la de los detergentes no iónicos (4-6 mM), lo que facilita su eliminación de las muestras por diálisis, ya que no es necesario disminuir tanto la concentración para que las micelas se disocien generando monómeros de detergente libres que salen a través de los poros de la membrana. Además el CHAPS parece más efectivo que los detergentes no iónicos para prevenir la agregación inespecífica de la proteína, que podría ocurrir por contactos de las zonas hidrofóbicas de la proteína no protegidas por el



detergente (Cladera et al., 1997). En cuanto a la relación detergente/lípido utilizada, el seguimiento de la absorción aparente de luz por parte de la muestra a diferentes concentraciones de CHAPS mostró un requerimiento de una relación molar detergente/lípido bastante elevada, de 5.9. Otros autores concluyeron que una relación de 1.04 es suficiente para llevar a cabo la solubilización completa de liposomas con CHAPS (Cladera et al., 1997), aunque en ese caso se trató de liposomas unilamelares, que podrían ser solubilizados más fácilmente que las complejas estructuras multilamelares del surfactante pulmonar. Además hay que tener en cuenta que la relación detergente/lípido para la solubilización con CHAPS es dependiente de la composición lipídica, es decir, de la diferente naturaleza de las cabezas polares y cadenas de acilo de los lípidos de la muestra. De esta manera, un estudio detallado de la interacción de este detergente con diferentes lípidos, concluyó que debido al diferente empaquetamiento, las membranas que contienen DPPC o colesterol requieren una mayor concentración de CHAPS para alcanzar la formación de micelas mixtas de detergente y lípido, y por tanto para comenzar el proceso de solubilización (Schurholz, 1996). El hecho de que la DPPC sea el lípido mayoritario del surfactante, y que éste además contenga colesterol, explicaría la elevada relación detergente/lípido necesaria para solubilizar el surfactante con CHAPS.

El estudio electroforético en condiciones nativas del surfactante solubilizado con detergente mostró la existencia de asociaciones de las proteínas del surfactante en forma de grandes complejos de elevado tamaño molecular, similares en los 3 detergentes estudiados, lo que sugiere que dichas estructuras no son debidas a la agregación inespecífica de las proteínas, sino que **la solubilización suave del surfactante permite la obtención de complejos en los que se preservan interacciones proteína-proteína nativas**. La banda de tamaño en torno a 670 kDa observada podría estar constituida principalmente por la SP-A, ya que esta proteína forma oligómeros de hasta 650 kDa (18 monómeros de hasta 36 kDa). La banda de 230 kDa podría corresponder también a SP-A con un menor grado de oligomerización. Los monómeros de la SP-A se organizan en trímeros en los que una parte de la estructura establece una triple hélice colagénica relativamente estable, incluyendo la formación de algunos puentes disulfuro. En la estructura supramolecular nativa de la SP-A, 6 trímeros se asocian mediante el establecimiento de interacciones no covalentes entre las triples hélices y de puentes disulfuro en el extremo N-terminal (Sanchez-Barbero et al., 2007). Dado que la electroforesis se desarrolló en condiciones nativas sin el empleo de agentes reductores, ni desnaturalizantes (SDS), cabría esperar que la SP-A se encontrara oligomerizada totalmente en forma de octadecámero. No obstante la solubilización llevada a cabo con estos detergentes, aunque suave, podría haber dado lugar a una disociación de los trímeros de manera que la banda en torno a 230 kDa correspondería a oligómeros formados por 2 trímeros. Alternativamente, es posible que una fracción de la proteína se encuentre en esta forma de oligomerización reducida asociada a las estructuras del surfactante. La existencia de dichos hexámeros de SP-A se ha descrito también por otros autores en la SP-A humana purificada del surfactante mediante extracción con butanol y

octilglucósido, tanto en electroforesis en presencia de SDS como incluso en electroforesis nativas sin detergente alguno, aunque se desconoce el posible efecto del método de purificación en la proteína y si éste podría influir en la aparición de formas menos oligomerizadas que el octadecámero (Sanchez-Barbero et al., 2005; Sanchez-Barbero et al., 2007). Por otro lado, recientes experimentos realizados mediante NMR han mostrado que el estado oligomérico de la SP-A podría no consistir realmente en octadecámeros cuando la proteína se encuentra asociada a lípidos, encontrándose asociaciones de 3, 9, 10 y 12 moléculas de SP-A en diferentes micelas lipídicas (Sarker et al., 2011). Estos datos concuerdan por tanto con la presencia de oligómeros menores al octadecámero de SP-A en las muestras, así como en otras preparaciones conteniendo esta proteína sin purificar en un ambiente acuoso (Hickling et al., 1998; Sanchez-Barbero et al., 2005).

Otras explicaciones posibles a la presencia de esta banda sería la existencia de homo o hetero-oligómeros con otras proteínas del surfactante. En el caso de la SP-B, la existencia de la asociación de unos 12 dímeros de proteína daría cuenta de un complejo con una masa similar.

Por otro lado, la estimación de la masa molecular de bandas superiores a 1000 kDa resulta complicada debido a la falta de patrones adecuados, aunque su elevada masa sugiere una composición que incluya principalmente oligómeros de SP-A. No obstante, tal y como mostró el análisis electroforético de este complejo en condiciones desnaturalizantes y reductoras, en él existen también proteínas de menor tamaño, como la SP-B, lo que podría significar la existencia de formas oligoméricas de SP-B de tamaño comparable al de ciertos oligómeros de SP-A, o más probablemente, complejos SP-A/SP-B. Estos resultados podrían **sugerir la existencia de interacciones nativas entre la SP-A y las proteínas hidrofóbicas** que podrían estar implicadas en la formación de grandes complejos proteicos en el surfactante. La existencia de este tipo de interacciones explicaría ciertas acciones conjuntas de dichas proteínas en el comportamiento funcional del surfactante, como la necesidad de la existencia de ambas proteínas para la generación de mielina tubular o la potenciación por parte de la SP-A del efecto en la adsorción de las proteínas hidrofóbicas o los resultados obtenidos por NMR en cuanto a la interacción entre ambas proteínas mediada por lípidos (Taneva y Keough, 2000; Perez-Gil, 2008; Sarker et al., 2011).

Aunque la solubilización del surfactante con los 3 detergentes utilizados generó complejos proteicos de tamaños aparentemente similares, tal y como muestra la electroforesis nativa, la centrifugación en gradiente de sacarosa reveló una distinta naturaleza de esas asociaciones en cada uno de ellos, dando lugar a dos comportamientos diferentes en el gradiente, según se observa por el perfil de absorbancia y por la cuantificación de fosfolípidos en las fracciones: separación de dos tipos de complejos de diferente densidad e interacción con lípidos tras la solubilización con digitonina o CHAPS y obtención de un único tipo de complejo, asociado a lípidos, tras solubilización con dodecilmaltósido. El hecho de que los complejos solubilizados

con dodecilmaltósido muestren una densidad homogénea, interaccionando todos ellos con lípidos, podría deberse a una solubilización incompleta del surfactante con este detergente, de manera que los dos tipos de complejos separados por la solubilización con los otros dos detergentes, permanecieran aun asociados tras el tratamiento con dodecilmaltósido. Otra posibilidad sería que la solubilización con el dodecilmaltósido fuera tan efectiva como en el caso de los otros dos detergentes, lo que explicaría el patrón de bandas similar en la electroforesis nativa, de manera que se generaran complejos proteicos de tamaño similar a los producidos por la solubilización con CHAPS o digitonina, pero conteniendo lípidos en el caso del dodecilmaltósido, lo que haría que mostraran una densidad similar en la centrifugación en el gradiente de sacarosa, a pesar de tener tamaños diferentes.

Respecto a la composición proteica de las diferentes fracciones resueltas en la centrifugación en gradiente de densidad, cabe destacar que todos los complejos obtenidos por solubilización con los 3 detergentes utilizados contienen tanto SP-A como SP-B y SP-C. Además se observó un patrón de bandas similar en los complejos de menor densidad, asociados a lípidos, tras la solubilización con CHAPS, digitonina o dodecilmaltósido, constituidos todos ellos por monómeros de SP-C, oligómeros de SP-A que podrían corresponder a dímeros o trímeros (80 kDa) y a hexámeros (en torno a 200 kDa) y oligómeros de SP-B que incluirían dímeros, trímeros, tetrámeros (bandas hasta 36 kDa) y otras formas más oligomerizadas de tamaños en torno a 65 y 175 kDa.

Estos resultados sugieren por tanto la existencia de complejos proteicos altamente oligomerizados en el surfactante en condiciones nativas, en los que las proteínas del surfactante podrían interaccionar entre sí para asociarse en grandes complejos macromoleculares.

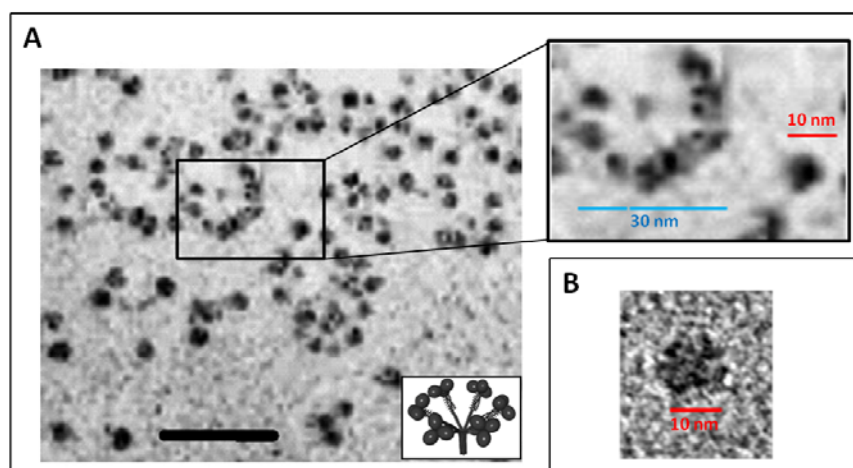
### **Los complejos obtenidos por solubilización del surfactante con CHAPS presentan diferente densidad y tamaño**

Dado que la solubilización con CHAPS dio lugar a una población de complejos más definida desde el punto de vista de su densidad y comportamiento electroforético, se utilizó este detergente para proseguir con el estudio de los distintos complejos proteicos obtenidos por solubilización del surfactante.

Por un lado el estudio de las muestras de fracción lipídica de surfactante suplementado con SP-B reveló la existencia de complejos de SP-B con propiedades similares a las proteínas solubilizadas con CHAPS en cuanto a su movilidad en el gradiente de densidad.

Por otro lado las imágenes de microscopía electrónica y de fuerza atómica de las fracciones obtenidas tras la centrifugación en gradiente, revelaron la presencia, sólo en el pico de complejos de mayor densidad, de partículas de forma y tamaño definidos, de aproximadamente 10 nm según la estimación por microscopía electrónica. Según se observa en las imágenes de microscopía electrónica (figura **83B**) los complejos de 10

nm estarían a su vez constituidos por partículas más pequeñas que parecen asociarse dando lugar a formas redondeadas. Dado que el contenido de SP-A en la muestra es elevado, tal y como reveló la inmunodetección, los oligómeros observados por microscopía podrían corresponder a dicha proteína. Sin embargo, la comparación de las imágenes con micrografías de SP-A existentes en la literatura (Sanchez-Barbero et al., 2005) parece sugerir una organización diferente a la de esta proteína (figura 83). Las imágenes de SP-A muestran que partículas de 10 nm se asocian en ramilletes que constituyen el hexámero de trímeros, mientras que las partículas de 10 nm obtenidas en el pico 1 del gradiente de densidad aparecen aisladas en la micrografía. No se puede descartar por tanto que las partículas de la muestra obtenida por solubilización con CHAPS estén formadas por otra proteína altamente oligomerizada, y no SP-A como cabría suponer por su gran tamaño. Esta proteína podría tratarse de SP-B, ya que se observaron oligómeros de elevada masa molecular de esta proteína mediante inmunodetección.



**Figura 83. A.** Micrografía electrónica de SP-A formando oligómeros, como el octadecámero representado en el dibujo de la esquina inferior derecha (Sanchez-Barbero et al., 2005). La barra de escala corresponde a 50 nm y a la derecha se muestra un detalle ampliado. **B.** Imagen de microscopía electrónica que muestra una partícula observada en el pico 1 de la centrifugación en gradiente de densidad del surfactante solubilizado con CHAPS.

Por último se estudió la existencia de complejos de diferente tamaño en el surfactante solubilizado con CHAPS mediante su separación en cromatografía de penetrabilidad. Los resultados mostraron la existencia de al menos dos tipos de complejos en cuanto al tamaño, que se corresponden además con los dos picos de diferente densidad, y que al igual que en el caso de éstos presentan una composición proteica heterogénea formada por SP-A, SP-B y SP-C, en diferentes grados de oligomerización.

**Los complejos enriquecidos en SP-B aislados por solubilización del surfactante con CHAPS poseen una estructura similar a la de la SP-B obtenida en disolvente orgánico, aunque presentan un estado de oligomerización superior al de las proteínas extraídas en disolvente orgánico**

El segundo objetivo de este capítulo consistió en la obtención y caracterización de formas nativas supradiméricas de SP-B que podrían desempeñar un papel importante en la funcionalidad del surfactante pulmonar, y cuya oligomerización podría ser destruida por la utilización de disolventes orgánicos.

La obtención de complejos de SP-B libres de la proteína mayoritaria del surfactante, SP-A, fue posible gracias a una cromatografía de intercambio iónico en la que se retuvieron complejos catiónicos constituidos mayoritariamente por SP-B, aunque también conteniendo cantidades variables de SP-C. En primer lugar cabe destacar la presencia de SP-B también en la fracción no retenida en la columna, lo que puede implicar **una interacción fuerte de esta proteína con la SP-A**, tal y como sugerían los resultados de la electroforesis nativa de surfactante solubilizado con CHAPS.

La estructura secundaria de los complejos resultó prácticamente idéntica a la de la SP-B aislada en disolvente orgánico, obteniéndose unos espectros de dicroísmo circular muy similares para ambas proteínas. Aunque se ha determinado un ligeramente mayor contenido en  $\alpha$ -hélice para la SP-B en micelas de LPC (52%) que el descrito anteriormente en la literatura para esta proteína en diferentes ambientes lipídicos, alrededor de un 40-45% (Vandenbussche et al., 1992a; Morrow et al., 1993; Perez-Gil et al., 1993), las diferencias pueden ser debidas exclusivamente a los diferentes métodos de ajuste, pues los espectros obtenidos para la SP-B en LPC resultaron ser casi idénticos a los previamente publicados.

Los espectros de emisión de fluorescencia del triptófano de la SP-B aportan información sobre la región N-terminal en la que se encuentra el único triptófano de la proteína, mientras que la única tirosina de la proteína se localiza en la posición 54, en la hélice 3 según la alineación de la secuencia de la SP-B con la saposina B (Andersson et al., 1995) o entre las hélices 3 y 4 según la alineación con la NK-lisina (Zaltash et al., 2000). Los dos controles de SP-B utilizados mostraron espectros de emisión prácticamente idénticos, lo que implica que las diferencias observadas en el espectro de la proteína solubilizada en detergente con respecto a estos dos controles son debidas a la utilización del disolvente orgánico en el aislamiento de la proteína, sin que la exposición al detergente después de que la proteína haya pasado por el disolvente orgánico produzca una reversión de este efecto sobre la estructura de la SP-B. El cambio en el espectro de la proteína en detergente respecto a los controles de SP-B fue muy sutil, y consistió en un ligero desplazamiento de los máximos de emisión al rojo, lo que sugiere una mayor exposición del triptófano a un ambiente polar. Este ambiente particular del triptófano de la SP-B en la proteína que no ha estado nunca expuesta a disolvente orgánico, puede ser indicativo de la conformación realmente nativa, asociada

o no a la participación de la proteína en complejos macromoleculares, que podrían ser parcial o totalmente desorganizados si la proteína se expone a disolvente orgánico.

Cuando se examinó la estructura cuaternaria de la proteína purificada en detergente, se observó la presencia de oligómeros de SP-B en la electroforesis en condiciones nativas. El empleo de la sonda Blue G-250 permite la separación de las proteínas esencialmente en función de su tamaño, pues la sonda aporta un componente homogéneo de carga negativa (Krause, 2006). No obstante, la combinación de la sonda negativa con la presencia de un detergente eléctricamente neutro (el CHAPS en este caso), podría mimetizar ciertas propiedades de los detergentes aniónicos, causando la disociación de algunos complejos proteicos. Las condiciones más suaves de la electroforesis nativa CN (“Clear Native”) pueden eludir este problema ya que permite conservar ensamblados proteicos de una manera más efectiva que la “Blue-Native”, aunque en este caso no es posible la determinación precisa de tamaños moleculares debido al efecto en la migración de la carga de la proteína, por lo que además sólo puede utilizarse para proteínas con bajos puntos isoeléctricos (Wittig y Schagger, 2005). El tamaño molecular de los oligómeros de SP-B observados parece encontrarse alrededor de los 150-200 kDa, aunque la estimación no es del todo precisa ya que las bandas aparecen muy anchas y poco definidas, lo que podría deberse a la existencia de diferentes oligómeros en esa región de tamaño, o a una deficiente incorporación de la sonda a los complejos. La existencia de complejos proteicos de elevada masa molecular en la muestra se confirma no obstante por los resultados de la centrifugación analítica, que mostraron la existencia de varios picos que podrían corresponder a tetrámeros, hexámeros, decámeros o incluso oligómeros mayores de SP-B.

### **Los complejos purificados por solubilización del surfactante con CHAPS muestran un comportamiento tensioactivo similar al de la SP-B obtenida en disolvente orgánico**

La función tensioactiva de la proteína en detergente se evaluó y comparó con la de la SP-B en disolvente orgánico en un surfactómetro de burbuja cautiva, una técnica que permite obtener información del comportamiento interfacial de películas lipoproteicas surfactante-miméticas en condiciones cuasi-fisiológicas, simulando los ciclos de compresión-expansión que supuestamente ocurren durante la inspiración y espiración en los alveolos, mimetizados por una burbuja de aire en condiciones ambientales controladas (Zuo et al., 2008).

La caracterización funcional de muestras reconstituidas a partir de la proteína purificada en detergente supuso un reto importante. Considerando que los ensayos funcionales evalúan la capacidad tensioactiva de los complejos lipoproteicos, era esencial la puesta a punto de un método de reconstitución que asegurara al máximo la eliminación de trazas de detergente, pues las propias propiedades tensioactivas de éste podrían enmascarar la correcta evaluación funcional de los complejos de surfactante. Los resultados de los ensayos funcionales garantizan un efecto perturbador mínimo del

detergente presente inicialmente en las muestras de proteína, y el método de reconstitución optimizado permite así la integración de formas de proteína preservadas en su forma nativa en muy diferentes ambientes lipídicos, lo que ha permitido un análisis detallado de su funcionalidad. Aún así, no se puede descartar que la exposición, aunque sea transitoria, al detergente, no introduzca algunas diferencias cuando se compara el comportamiento biofísico de la proteína purificada en detergentes y la obtenida en disolventes orgánicos, como se discute a continuación.

### ***Efecto de las posibles trazas de detergente en las muestras***

En primer lugar es importante resaltar los resultados obtenidos con los controles de lípido expuestos a detergente, pues son los que permiten validar el método de reconstitución con respecto al posible artefacto de la presencia de trazas de detergente. Estos controles se prepararon del mismo modo que la proteína en detergente, añadiendo a las suspensiones lipídicas el tampón de elución de la columna de intercambio iónico utilizado para la purificación, que contiene CHAPS, en lugar de la proteína. Tras la eliminación del detergente con las Bio-Beads, los controles se sometieron, al igual que las muestras con proteína, a una ultracentrifugación para concentrar el material. Estos controles sirvieron por un lado para descartar el posible efecto tensioactivo de las trazas de detergente residual, y por otro lado para dar una idea de las posibles pérdidas de material que podrían ocurrir durante la preparación de las muestras. Las conclusiones extraídas del comportamiento de estos controles indican claramente que, si existen trazas de detergente en las muestras, éstas no poseen un papel tensioactivo evidente, ya que en ningún caso se observó una mejor adsorción o comportamiento anómalo en los ciclos de compresión-expansión de estos controles con respecto a los controles de lípido sólo o lípido con SP-C no expuestos a detergente. Se puede en este sentido afirmar que la función tensioactiva observada en las muestras con proteína es únicamente debida a la presencia de ésta, y no a las trazas de detergente.

Por otro lado, sí se observaron algunas diferencias en el comportamiento de los controles expuestos a detergente respecto a los controles no expuestos, suponiendo en general una ligeramente menor actividad del control expuesto a detergente en las composiciones ensayadas que presentaban una mejor actividad, principalmente aquellas que contenían SP-C o fracción lipídica de surfactante. La disminución en la función de estos controles puede achacarse a una pérdida parcial de material durante la preparación de las muestras. En primer lugar podría producirse una pérdida de lípidos por adhesión de éstos a las partículas Bio-Beads, aunque la capacidad de adsorción de lípidos de estas partículas es mucho menor que para los detergentes (Rigaud et al., 1997). En segundo lugar podrían producirse pérdidas de lípido y proteína durante la ultracentrifugación efectuada para concentrar estas muestras. Mientras los controles no expuestos a detergente fueron preparados directamente a una concentración de 25 mg/ml de fosfolípido, necesaria para el ensayo en CBS, las muestras con proteína purificada en detergente tuvieron que ser sometidas a una etapa de concentración por centrifugación debido a que, para alcanzar las concentraciones de proteína necesarias se añadieron

volúmenes relativamente grandes de la solución de proteína a la muestra. Fue por tanto necesario calcular las pérdidas de lípido producidas durante el proceso, para preparar las muestras a una concentración tal que la concentración final tras la centrifugación fuera la deseada (25 mg/ml). La evaluación de la concentración de fosfolípidos en las muestras se realizó mediante una valoración de fósforo, siendo este método incompatible con la utilización de tampones fosfato como los utilizados para la cromatografía de intercambio iónico en los que se encontraba la proteína purificada en detergente. Debido a esto, y a la reducida cantidad de proteína disponible, se estimaron las pérdidas de lípido por centrifugación en controles de lípido sin tampón de elución, estimándose que estas pérdidas eran similares. No obstante, ya que estas pérdidas fueron calculadas a partir de la centrifugación de lípido sin tampón de elución, y por tanto no expuesto a detergente, cabe la posibilidad de que la presencia de trazas de detergente, dé lugar a una disminución significativa de la cantidad de muestra precipitada durante la centrifugación, produciéndose por tanto pérdidas de lípido y proteína mayores que las estimadas. Podría achacarse por tanto el peor funcionamiento de estos controles a la pérdida de algo de material durante la centrifugación de las muestras.

***Necesidad de una mayor concentración de proteína purificada con detergente que de SP-B purificada con disolvente orgánico para un similar nivel de actividad***

Los mismos problemas descritos en el apartado anterior para la preparación de los controles de lípido y lípido con SP-C pre-expuestos a detergente, podrían explicar, al menos en parte, por qué se necesitaron concentraciones de proteína del 3% para alcanzar una función tensioactiva similar a la de la SP-B en disolvente orgánico al 1%. Podría ocurrir que aún introduciendo una proporción teórica de proteína purificada en detergente del 3%, la concentración real de proteína incorporada en los complejos fuera menor. Para comprobar la existencia de pérdidas de proteína se valoró la concentración de ésta en las muestras (lípido sintético o fracción lipídica sin SP-C con proteína en detergente, tras la utilización de las BioBeads y centrifugación) encontrándose efectivamente una menor concentración de proteína de la esperada, en torno al 2% (p/p) en lugar del 3%. No obstante, tal y como se ha explicado en el apartado anterior, los resultados sugieren que las pérdidas de lípido podrían ser mayores en el caso de las muestras que han pasado por detergente, lo que significaría que la concentración real de proteína en la muestra sería mayor a 2%.

Aún en el caso de que la concentración real de proteína fuera el 2% existe todavía un requerimiento de mayor concentración de proteína que en el caso de la SP-B obtenida en disolvente orgánico (1%). Una explicación posible sería la diferente interacción con los lípidos de ambas proteínas, de manera que en el caso de la obtenida en disolvente orgánico toda la proteína estaría forzada a formar interacciones con el lípido, mientras que en el caso de la proteína aislada en detergente podría ocurrir que partes de las regiones hidrofóbicas de la proteína estén formando parte de interacciones proteína-proteína, reduciendo el posible efecto sobre las bicapas lipídicas. Otra



posibilidad a tener en cuenta es que la orientación de la proteína en las películas de lípido tuviera que ser importante para desempeñar eficientemente su papel de promover la interacción entre las membranas, de manera que al formar los complejos sólo una parte de la proteína purificada en detergente podría encontrarse en la orientación correcta para ello, lo cual depende del proceso de eliminación del detergente y reconstitución en los lípidos (Silvius, 1992; Rigaud et al., 1997).

En cualquier caso, la comparación del comportamiento funcional de la SP-B purificada en detergente y la obtenida en disolvente orgánico debe ser realizada más en términos cualitativos que cuantitativos. Hay que tener en cuenta que la reconstitución de complejos lipoproteicos a partir de mezclas de lípido y proteína en disolvente orgánico está sometida a mucha menor manipulación e incertidumbre con respecto a la cantidad total de proteína que finalmente llega al lípido, se dispersa en él y adopta la disposición definida.

***Comportamiento tensioactivo de las proteínas estudiadas: proteína purificada en detergente, SP-B purificada en disolvente orgánico y SP-C***

En primer lugar cabe distinguir las diferencias observadas entre el proceso de adsorción inicial y post-expansión. La deposición de la muestra en la cámara del CBS puede realizarse de dos maneras: en la subfase acuosa constituida por el tampón con sacarosa, en cuyo caso el surfactante alcanzará la burbuja y se adsorberá a la interfase, o bien como se ha realizado en estos experimentos, directamente sobre la burbuja de manera que la adsorción inicial monitorizada se debe en realidad a la extensión (o spreading) del material a lo largo de la interfase aire-líquido. Posteriormente se induce una expansión de la burbuja y se monitoriza la adsorción del material a la nueva interfase abierta, lo que muestra la capacidad del surfactante para incorporar material que permanece asociado a la interfase en el “reservorio superficial” (Schurch et al., 1998). De esta forma, la adsorción post-expansión refleja con más precisión el proceso de adsorción, ya que además de evitar artefactos debidos a la aplicación de la muestra, como los derivados de la proximidad del capilar con el que se inyecta a la burbuja, se mimetiza de manera más real el proceso tal y como sucede in vivo en el alveolo.

La proteína purificada en detergente indujo cinéticas de adsorción similares a las promovidas por la SP-B obtenida en disolvente orgánico en todos los casos en los que se dio alguno de estos 3 requisitos: reconstitución realizada directamente con el lípido en forma de MLVs, presencia de fracción lipídica del surfactante en la mezcla, o presencia de SP-C. En los casos en que ninguna de estas tres características estuvo presente en las muestras, la proteína en detergente presentó una menor capacidad para inducir la rápida adsorción hasta alcanzar tensiones superficiales típicas de equilibrio. No obstante, esta relativamente menor capacidad de adsorción no se reflejó de igual manera en el comportamiento de los ciclos de compresión/expansión, encontrándose que la proteína fue completamente eficaz en los ciclos dinámicos, y sólo en los cuasiestáticos no fue capaz de alcanzar tensiones superficiales mínimas similares a las

obtenidas por la SP-B procedente de disolvente orgánico. Estas diferencias son de nuevo consistentes con un mero factor cuantitativo.

### ***Papel de la composición lipídica en la función de la SP-B***

Tal y como se explicó en la introducción, la adsorción de fosfolípidos a la interfase aire-líquido depende de diversos factores, de los cuales los más importantes son i) la concentración de surfactante (Walters et al., 2000), ii) las interacciones entre las membranas, o entre las bicapas del reservorio y la monocapa interfacial que dependen de la presencia de fosfolípidos insaturados y de las proteínas hidrofóbicas SP-B y SP-C (Perez-Gil y Keough, 1998), iii) y la perturbación de las membranas para permitir la inserción de los lípidos en la interfase (Nag et al., 1997).

La importancia de la composición lipídica nativa en los experimentos funcionales es claramente apreciable por la mejora en la actividad de la proteína cuando se incluye fracción lipídica del surfactante en la muestra en lugar de la mezcla sintética DPPC/POPC/POPG, cuya utilización supone una simplificación del sistema lipídico del surfactante que refleja la composición de sus lípidos mayoritarios y la presencia de fosfolípidos aniónicos, POPG, importantes por su interacción selectiva con las proteínas hidrofóbicas (Perez-Gil et al., 1995). Los resultados muestran por tanto la importancia de otras especies fosfolipídicas minoritarias y probablemente también del colesterol para proporcionar la dinámica adecuada al sistema (Bernardino de la Serna et al., 2009) potenciando así la adsorción y la reextensión del material durante la inspiración (Taneva y Keough, 1997; Veldhuizen et al., 1998), lo que se ve reflejado en las cinéticas de adsorción inicial y post-expansión más rápidas, y de ciclos cuasiestáticos más eficientes.

La ineficiencia de la SP-B aislada en detergente para producir buenos ciclos cuasi-estáticos en presencia de la mezcla simplificada puede estar de nuevo relacionada con la presencia de trazas de detergente. En un trabajo reciente, se ha descrito cómo el efecto detergente de las sales biliares presentes en el meconio es responsable de la alteración de los ciclos cuasiestáticos en el CBS, muy similar a la aquí observada (Lopez-Rodriguez et al., 2011). Aunque el comportamiento de los controles sin proteína descartaba una acción importante de trazas de detergente en las membranas, cabe la posibilidad de que algunas moléculas de detergente permanezcan asociadas a los complejos proteicos, alterando la función de la proteína particularmente en condiciones estáticas, donde las cinéticas lentas de compresión-expansión permiten la observación de ciertos efectos. La reconstitución en la mezcla lipídica compleja, y/o la presencia de SP-C, puede ayudar a terminar de desplazar esas moléculas remanentes de detergente en la vecindad de las proteínas, con lo que la SP-B puede mostrar su actividad óptima también en los ciclos cuasiestáticos.

### ***Papel de la presencia de SP-C en la función de la SP-B***

En cuanto a la presencia de SP-C, se ha descrito que esta proteína favorece la adsorción interfacial de los lípidos (Weaver y Whitsett, 1991; Nag et al., 1996b),

aunque las tensiones mínimas alcanzadas en presencia de solo SP-C no son tan bajas como las logradas por las mezclas que contenían únicamente SP-B (Schurch et al., 1998). No obstante parece existir cierta cooperación entre ambas proteínas reflejada en cinéticas de adsorción más rápidas que en presencia de una sola de ellas, principalmente en la adsorción post-expansión, lo que podría indicar una mejora en la incorporación de los lípidos del reservorio a la película interfacial (Schurch et al., 2010).

En los experimentos de esta Tesis también se ha observado una mejora de la adsorción en presencia de SP-C, tanto en el caso de muestras conteniendo SP-B preparada en disolvente orgánico, como en el de LUVs de la mezcla lipídica sintética con proteína purificada en detergente. Por otro lado también se ha determinado que la presencia de SP-C mejora el comportamiento de los ciclos cuasiestáticos en cuanto a las tensiones mínimas alcanzadas y la menor reducción de área necesaria para alcanzarlas. Este efecto se observó en las mezclas de lípido sintéticas tanto con SP-B preparada en disolvente orgánico como con la proteína purificada en detergente (sea reconstituida en MLVs o añadida a LUVs). Este efecto podría estar mediado por la capacidad atribuida a la SP-C de estabilización de las películas de surfactante durante ciclos sucesivos de compresión, gracias a la asociación permanente de las bicapas que contienen SP-C con la película interfacial a través de la palmitoilación de la proteína (Schurch et al., 1998; Gomez-Gil et al., 2009; Baumgart et al., 2010).

#### ***Efecto del método de reconstitución en la actividad de los complejos lipoproteicos***

Por último es interesante comentar la menor actividad interfacial de las muestras reconstituidas añadiendo la proteína purificada en detergente a LUVs preformadas de lípido cuando se comparan con MLVs preparadas ya en presencia de proteína. La menor actividad de las LUVs con respecto a las MLVs se observa tanto en presencia como en ausencia de la proteína.

Dado que los controles de lípido de surfactante y lípido con SP-C no fueron sometidos a ningún tipo de manipulación tras su rehidratación, podemos concluir que su menor actividad no es debida a efectos metodológicos, sino a que el comportamiento de los lípidos y las proteínas hidrofóbicas del surfactante se ve favorecido por la reconstitución en forma de suspensiones multilamelares en comparación con las unilamelares. Los efectos observados en las mezclas con SP-C podrían reflejar la importancia de la asociación de estructuras lipídicas más complejas que las simples vesículas unilamelares a la interfase aire-líquido, de manera que las vesículas multilamelares se parecerían más a las estructuras reales que se observan en el surfactante. Las vesículas unilamelares darían lugar a una adsorción menos cooperativa de material a la interfase, y la menor cantidad de material disponible podría ser responsable del peor funcionamiento durante los ciclos de compresión-expansión. No obstante, la actividad observada durante la dinámica de compresión y expansión de los lípidos de surfactante sin SP-C muestra que, aunque la adsorción sea similar en MLVs y LUVs, el material adsorbido a partir de estas últimas no es capaz de mantener la

estabilidad de la película. Estos datos podrían estar relacionados con los encontrados por otros autores según los cuales la adsorción rápida de las películas de surfactante estaría ligada a la generación de películas más estables durante las compresiones cuasiestáticas o dinámicas (Schurch et al., 1998).

Este comportamiento podría ser común al observado en muestras en las que la proteína se añadió a LUVs preformadas, de modo que la actividad de la SP-B podría depender de que el material lipídico formara un continuo de membranas similar al que se produce en las MLVs. De esta manera, los efectos potenciadores de la función tensioactiva llevados a cabo por la SP-B a través de su capacidad de empaquetar y generar contactos entre las membranas, serían mucho más efectivos en el caso de las MLVs.

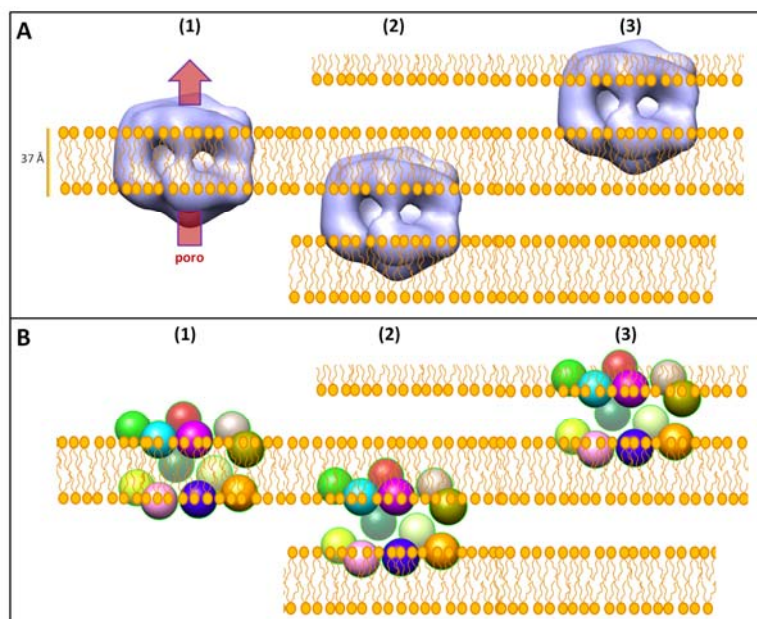
Por otro lado, la utilización clásica de disolventes orgánicos en la purificación de las proteínas hidrofóbicas del surfactante conllevaba la reconstitución de las proteínas de una manera directa junto con los lípidos. La presencia de disolvente orgánico además podría forzar a las zonas hidrofóbicas de la proteína a una interacción obligada con los lípidos. En el caso de la proteína purificada en detergente añadida a las LUVs, existe la posibilidad de que la interacción de la SP-B con las membranas sea diferente a la generada por la reconstitución tradicional de las mezclas lipoproteicas, ya que algunas de las zonas hidrofóbicas de la proteína podrían estar protegidas por interacciones con el detergente o por interacciones proteína-proteína implicadas en la formación de oligómeros de la proteína. De hecho, estudios realizados sobre la interacción de SP-B en disolvente orgánico con lípidos, mostraron que la interacción con las membranas es más profunda cuando la proteína se reconstituye directamente con el lípido que cuando se inyecta a vesículas preformadas (Cruz et al., 1998).

La menor capacidad de la proteína para favorecer la adsorción interfacial cuando se reconstituye sobre LUVs, podría estar al menos en parte originada por la ausencia de aquellas interacciones de la SP-B con los lípidos creadas artificialmente por la presencia del disolvente orgánico durante la reconstitución. Si ello fuera así, los resultados podrían indicar que en condiciones nativas, la principal función de esta proteína en el surfactante podría no ser tanto promover la adsorción del material, como ayudar a alcanzar y mantener las tensiones superficiales mínimas durante la dinámica de compresión, dado que los ciclos dinámicos no se ven alterados como consecuencia de la reconstitución de la proteína en LUVs. La preparación de las muestras en forma de MLVs en las que el lípido se reconstituye directamente en presencia de la proteína, mimetizaría en mayor medida el comportamiento de la SP-B añadida en disolvente orgánico, en el sentido de que la proteína sería capaz de interactuar con el lípido desde ambos lados de las membranas en las vesículas, lo que concuerda con el hecho de que las cinéticas de adsorción de estas muestras sean similares a las de la SP-B en disolvente orgánico.

Existe por tanto la posibilidad de que las funciones asignadas hasta el momento a las proteínas hidrofóbicas del surfactante no sean tan solapantes como se ha propuesto a partir de multitud de experimentos realizados a partir de preparaciones de proteína en disolvente orgánico. El empleo del disolvente orgánico en la manipulación de la SP-B podría potenciar, quizá de manera artificial, funciones de esta proteína que serían distintas a las desarrolladas en condiciones más nativas en el surfactante.

### **La SP-B forma complejos definidos en forma de anillo**

La formación de oligómeros de SP-B en la proteína purificada en detergente resultó corroborada también por la observación de partículas de tamaño y forma definidas mediante microscopía electrónica. El análisis de las imágenes y la proyección del volumen tridimensional a partir de los diferentes tipos de partículas observadas (tomadas como vistas superior y lateral), sugiere que los complejos proteicos están formados por la superposición de dos anillos, cada uno de los cuales tendría aproximadamente 10 nm de diámetro y constaría de 5 o 6 subunidades proteicas asociadas alrededor de un poro central, de tamaño aproximado de unos 20 Å. El tamaño estimado en la vista lateral de los dos anillos superpuestos corresponde aproximadamente a 60 Å. En la figura 84 se muestra la comparación de su tamaño con el espesor de una bicapa de DPPC de 3.7 nm, lo que permite especular acerca de la posibilidad de que el complejo pueda encontrarse insertado en la bicapa, de manera que cada anillo, y cada subunidad proteica expondría parte de sus residuos a las regiones hidrofóbicas de los fosfolípidos mientras que los residuos polares interaccionarían con las cabezas polares de éstos. Por otro lado, la observación de las vistas superiores de los complejos permite apreciar claramente una asimetría de las partículas a ambos lados del poro central. Esto podría deberse a que la estructura de los complejos fuera realmente asimétrica, o bien a la existencia de varias partículas diferentes que fueron tomadas como una única para la generación de las medias, lo que parece poco probable ya que se compararon las partículas dentro de cada grupo con la media generada para cada uno de ellos. Puede existir además la posibilidad de que, aún siendo realistas las medias obtenidas, los dos tipos de partículas observados y considerados como vistas superior y lateral de los complejos, constituyan en realidad dos tipos diferentes de complejos con una distinta estequiometría o asociación de las subunidades; o dos conformaciones diferentes de un mismo complejo proteico. En el caso de que estos dos tipos de partículas constituyeran complejos distintos, o en distinta conformación, el hecho de que todas las partículas observadas en la muestra se puedan asignar a uno de los dos grupos de medias generados, implicaría bien que las vistas superior y lateral de las partículas son altamente similares, o que las partículas tienden a adoptar una orientación preferencial cuando se disponen sobre la rejilla de microscopía.



**Figura 84.** **A.** Vista lateral del volumen tridimensional creado a partir de las imágenes de microscopía electrónica de los complejos proteicos de SP-B purificados en detergente. Se muestra además a la misma escala una bicapa de 3.7 nm de grosor. Los complejos podrían encontrarse insertados en una bicapa (1), conectando bicapas distintas (2) o conectando una bicapa a la monocapa interfacial (3). **B.** Representación de las zonas de mayor densidad con un modelo de esferas en colores para mostrar la posible disposición espacial de las distintas subunidades de proteína con respecto a las membranas.

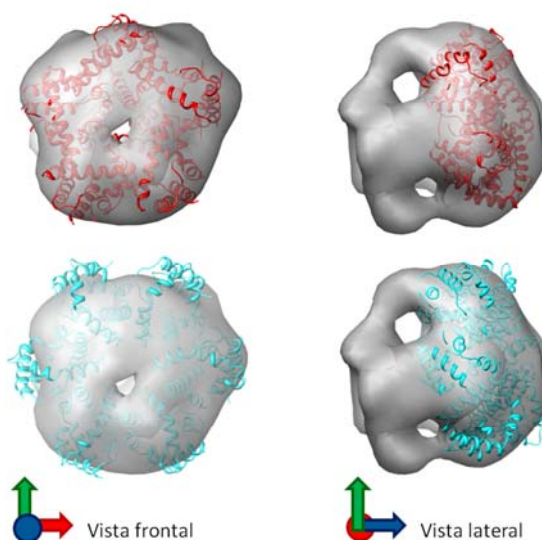
### **Correlación del modelo estructural propuesto para la SP-B con las características estructurales y funcionales de la proteína purificada en detergente**

Según lo discutido en este capítulo podemos concluir que el surfactante pulmonar en condiciones nativas posee una organización proteica mucho más compleja que la supuesta hasta el momento. La sustitución del disolvente orgánico por detergentes no desnaturalizantes ha permitido detectar la existencia de complejas interacciones entre las proteínas del surfactante que podrían ser de gran importancia para el funcionamiento óptimo del sistema. Ejemplo de estas interacciones serían las existentes entre SP-B y SP-A, sugeridas por la presencia de SP-B en las bandas que contienen oligómeros de SP-A en las electroforesis en condiciones nativas, y en la fracción aniónica no retenida de la cromatografía de intercambio iónico, y por la presencia de restos de SP-A en algunas de las fracciones catiónicas retenidas en dicha cromatografía. La existencia de interacciones entre ambas proteínas explicaría, como se ha discutido anteriormente, ciertos datos existentes respecto a su colaboración en funciones tales como la adsorción de los lípidos o la formación de la mielina tubular (Taneva y Keough, 2000; Perez-Gil, 2008; Sarker et al., 2011). Desde el punto de vista del modelo de oligomerización de la SP-B descrito en el primer capítulo de esta Tesis, podría especularse con la posibilidad de que los hexámeros de trímeros de SP-A pudieran interactuar con oligómeros de SP-B que podrían estar a su vez formados por 6 dímeros de esta proteína.

La segunda conclusión a la que se puede llegar a partir de los resultados obtenidos en este capítulo, es que la SP-B purificada tras solubilización del surfactante con CHAPS presenta una estructura secundaria y terciaria similar a la descrita hasta el momento para la SP-B obtenida en disolvente orgánico. No obstante se han detectado algunas diferencias sutiles que podrían indicar diferencias en la organización de la SP-B con respecto a la proteína en disolvente orgánico, como pequeños cambios en el espectro de emisión de fluorescencia de la SP-B.

La existencia de oligómeros de SP-B en las muestras de proteína purificada con detergente detectados por electroforesis nativa, centrifugación analítica y microscopía electrónica, supone sin duda el resultado más relevante de estos experimentos, y proporciona un soporte experimental al modelo de la SP-B presentado en el capítulo anterior de la presente Tesis. La estructura de estos complejos proteicos a baja resolución, resuelta por microscopía electrónica, muestra la superposición de dos anillos formados cada uno por 5 ó 6 subunidades proteicas.

En la figura 85 se muestra el resultado del ajuste del modelo de SP-B en el volumen obtenido a partir de las imágenes de microscopía electrónica. La comparación de estos oligómeros con los predichos por el modelo de la SP-B muestra por tanto que ambas aproximaciones resultan en una estructura común para la oligomerización de la proteína.



**Figura 85.** Vista frontal y lateral del ajuste del modelo de la estructura de un pentámero (en rojo) y hexámero (en azul) de dímeros de SP-B basado en la estructura de la saposina B, en el volumen obtenido a partir de las imágenes de microscopía electrónica. Los ajustes de modelos correspondientes a hexámeros o pentámeros, en conformaciones abiertas o cerrads, dieron como resultado en todos los casos coeficientes de correlación similares (en torno a 0.75).

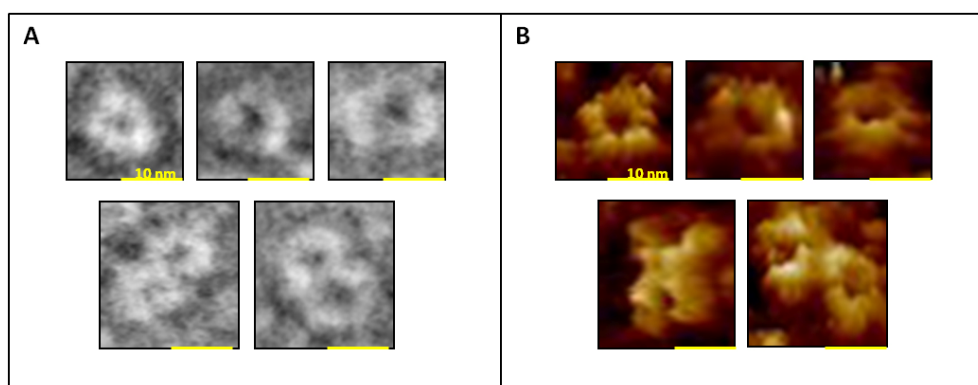
Cada uno de los dos anillos observados en las micrografías electrónicas correspondería a un oligómero de SP-B formado por la asociación de 5 ó 6 dímeros alrededor de un poro central. Por otro lado, el hecho de que las partículas purificadas consten de dos anillos uno sobre el otro, indicaría la existencia de una asociación fuerte entre oligómeros, que estaría de acuerdo con el apilamiento de diferentes membranas, que tal y como se discutió en el capítulo anterior, permitiría el movimiento a través de los complejos de lípidos de surfactante entre dos membranas o entre una membrana y la monocapa interfacial.

En los volúmenes tridimensionales creados a partir de las partículas observadas por microscopía se ha encontrado no obstante una asimetría, en las vistas superiores, de manera que ambos lados del anillo resultan diferentes en cuanto a su forma. Existe la posibilidad de que esto sea debido a la presencia de diferentes partículas en la muestra, de manera que la reconstrucción del volumen podría haber generado una “quimera” ficticia, una estructura que en realidad constituiría una mezcla de partículas diferentes. La presencia de diferentes partículas podría deberse a 3 posibilidades. En primer lugar, dado que el modelo no es capaz de atribuir mayor probabilidad de existencia a los oligómeros formados por 5 ó 6 dímeros de SP-B, y debido a que la baja resolución de las imágenes de microscopía no permite diferenciar de manera precisa el número de subunidades que constituyen el complejo, podría ocurrir que en realidad ambos tipos de oligómeros (pentámeros y hexámeros) existieran en la muestra. Una segunda posibilidad sería la existencia de 2 conformaciones diferentes del complejo, tal y como se propuso en el capítulo anterior, de manera que una parte de los oligómeros tendrían una estructura más abierta que otros, aunque estas diferencias no fueran discernibles a simple vista en las micrografías. Por último podría ocurrir que los anillos observados en las muestras estuvieran constituidos en parte por SP-C, que podría encontrarse asociada de alguna manera a algunos de los oligómeros de SP-B. Esta última posibilidad parece menos probable, ya que las inmunodetecciones para SP-C en las electroforesis en condiciones nativas no detectaron la presencia de esta proteína en las bandas oligoméricas de SP-B que aparecieron en el gel, aunque esto podría ser debido a la separación de las proteínas durante la electroforesis.

Llama la atención el hecho de que a pesar de existir cambios en la estructura, principalmente en la oligomerización, de la SP-B purificada con detergente en comparación a la obtenida con disolvente orgánico, estas muestras de proteína no presenten una actividad interfacial mucho mejor. Sería lógico pensar que la destrucción, por la exposición a disolventes orgánicos, de un oligómero especializado como el descrito por el modelo, cuya estructura estaría de acuerdo con el complejo detectado por microscopía, afectara a la función de la SP-B, lo cual no parece ocurrir según los ensayos realizados. Esto hace pensar que a pesar de la alteración de las interacciones proteína-proteína en la proteína purificada en disolvente orgánico, ésta podría ser capaz tras su reconstitución en lípidos de autoensamblarse dando lugar al oligómero observado en la proteína purificada en detergente. En el laboratorio en el que se ha realizado esta Tesis se han obtenido evidencias preliminares que demuestran la



capacidad intrínseca de la SP-B purificada en disolvente orgánico para asociarse en complejos similares a los descritos (resultados no publicados). La SP-B en disolvente orgánico puede dispersarse directamente en la interfase aire-líquido de una subfase acuosa para formar una película interfacial proteica, en ausencia o presencia de lípidos, que puede transferirse a un soporte de mica para su observación bajo el microscopio de fuerzas atómicas (AFM). Cuando las películas interfaciales de SP-B se prepararon en presencia de pequeñas cantidades del fosfolípido aniónico DPPG (relación lípido/proteína 10:1 en peso) se detectó la formación de estructuras anulares orientadas, muy similares en tamaño y forma a las obtenidas por tratamiento con detergente (figura 86).



**Figura 86.** Comparación de imágenes de microscopía electrónica obtenidas de la proteína purificada en detergente por la columna de intercambio iónico (A) y una proyección tridimensional de imágenes de microscopía de fuerza atómica obtenidas de una monocapa interfacial de SP-B purificada en disolvente orgánico, en presencia de fosfolípidos aniónicos, una vez transferida a mica (B). Las barras de escala corresponden en todos los casos a 10 nm.

Este resultado sugiere por lo tanto que para la formación de los oligómeros por la SP-B en disolvente orgánico, es necesaria la presencia de fosfolípido aniónico y la orientación adecuada de la proteína.

Todo lo expuesto anteriormente sugiere que el tratamiento con disolventes orgánicos rompe las interacciones proteína-proteína que en estado nativo son responsables de la formación del oligómero de SP-B. Estos oligómeros podrían constituir una estructura especializada de la proteína para optimizar el transporte de los lípidos entre las membranas del surfactante, y por tanto importante para desarrollar su función tensioactiva. La reconstitución de esta estructura en determinadas condiciones, permitiría sin embargo a la proteína asociarse de manera espontánea para dar lugar nuevamente al complejo oligomérico. Esta reconstitución podría ser más o menos eficiente en función de la presencia de una composición fosfolipídica adecuada y del método utilizado en la generación de los complejos lípido-proteína.

Los experimentos realizados con péptidos sintéticos parciales (SP-B<sub>1-25</sub> o SP-B<sub>1-37</sub>) o incluso con el péptido sintético completo, mostraron que para mimetizar ciertas

funciones de la SP-B es necesario una concentración de aquéllos mucho mayor que la necesaria con la proteína purificada (Lipp et al., 1996; Ryan et al., 2005). Igualmente, se requiere una mayor concentración de proteína y la presencia de fosfolípidos aniónicos cuando no existe el puente disulfuro intercatenario (Zaltash et al., 2001; Serrano et al., 2005). Por otro lado, la comparación de la actividad de los extractos orgánicos de surfactante con la del surfactante nativo, muestra que las estructuras nativas deben ser importantes para un funcionamiento óptimo del sistema (Schurch et al., 2010). Los resultados de esta Tesis advierten por tanto de la importancia del mantenimiento de la estructura de las proteínas hidrofóbicas del surfactante, y muy especialmente de la SP-B, para su función en las preparaciones de surfactante. Esto debe ser particularmente considerado en el desarrollo de nuevas preparaciones clínicas. Es difícil que la reconstitución de simples péptidos miméticos de estas proteínas pueda dar lugar a la formación de oligómeros de SP-B como los descritos, lo que necesariamente ha de suponer una capacidad funcional reducida.

Por otro lado, la solubilización de los complejos nativos de SP-B en detergentes podría mimetizar mejor la interacción de la proteína con las membranas de surfactante *in vivo*. Como se discutió en el capítulo anterior, la complejidad del precursor de la SP-B así como de su procesamiento, podría favorecer la correcta orientación y oligomerización de la proteína en el surfactante nativo, gracias al posible papel de los fragmentos N y C terminal de la proSP-B en la protección de las zonas hidrofóbicas de la proteína madura. Este papel de los propéptidos *in vivo* podría estar simulado *in vitro* por la solubilización de la proteína en detergente, frente a la exposición de las zonas hidrofóbicas de la SP-B que tiene lugar cuando ésta es aislada en disolventes orgánicos.

Sería por tanto de gran interés investigar la capacidad de preparaciones de surfactante generadas en condiciones que faciliten el mantenimiento de la estructura nativa de la SP-B, para rescatar pulmones afectados por patologías respiratorias aún no resueltas, como el distrés respiratorio agudo.

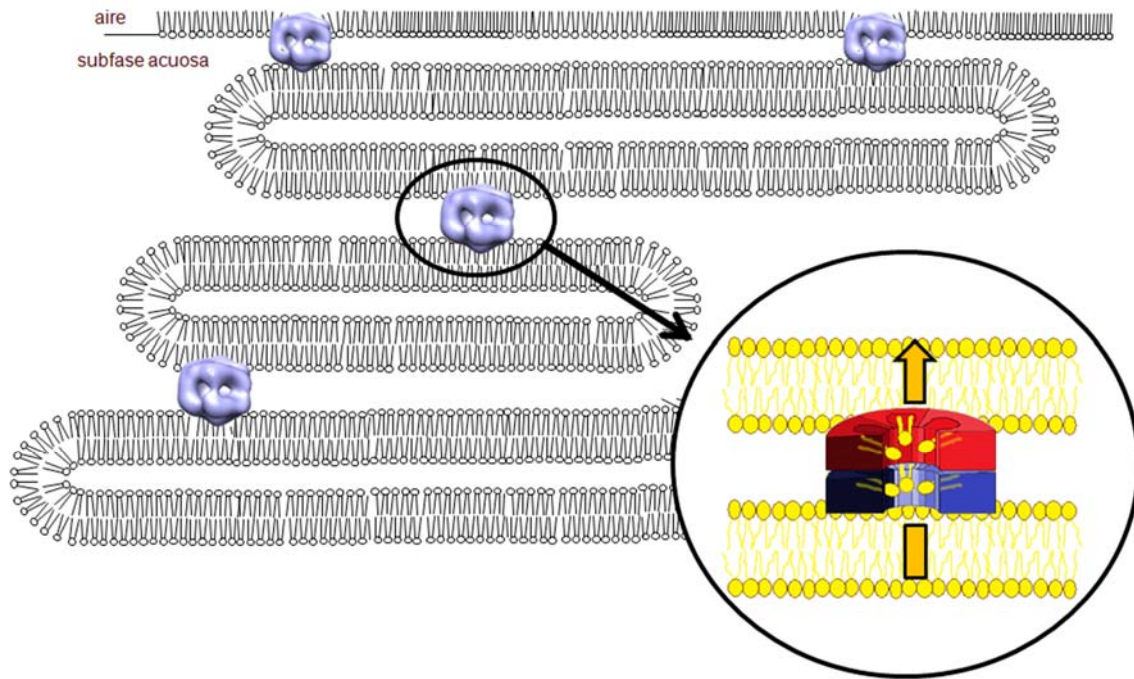
### **Mecanismo de acción propuesto para los complejos oligoméricos de SP-B**

La estructura oligomérica de la SP-B observada en las imágenes de microscopía electrónica es propuesta por tanto como un complejo especializado en optimizar el transporte de fosfolípidos a través de las estructuras del surfactante. La información extraída a partir de la modelización de la estructura de la proteína es importante para la asignación de dicha función al complejo, al basarse en la capacidad de la saposina B para transportar lípidos gracias a su estructura en forma de pinza. La capacidad de la SP-B para favorecer el intercambio fosfolipídico entre las membranas del surfactante posee una implicación funcional de vital importancia, favoreciendo de este modo la adsorción del material a la interfase desde la subfase acuosa o desde las bicapas que constituyen el reservorio.

La interpretación de la subfase acuosa bajo la monocapa interfacial como una “fase interfacial” en la que existe un continuo de membranas interconectadas, ha sido

sugerida en los últimos años, apuntando a una organización del surfactante como estructura completa y definida desde la liberación por parte de los neumocitos hasta la interfase, y no como una simple película interfacial (Follows et al., 2007; Perez-Gil, 2008). Según el mecanismo de acción propuesto en esta Tesis para la SP-B, el anillo oligomérico de SP-B (formado por 5 ó 6 dímeros) interaccionaría de manera relativamente superficial con las superficies polares de las membranas, quedando las caras hidrofóbicas de los dímeros expuestas a la cavidad. En cada una de estas cavidades hidrofóbicas podría asociarse un fosfolípido (figura 87), que interaccionaría a través de sus colas hidrofóbicas con los dímeros de proteína. De esta forma, las cabezas polares de los 5 o 6 fosfolípidos atrapados en el anillo de SP-B, formarían realmente un “poro” polar en el centro del anillo. En cualquier caso, la interacción de los fosfolípidos con los dímeros de SP-B desencadenaría un cambio conformacional que facilitaría el paso de los lípidos hacia la siguiente membrana. Además, cabría suponer que para evitar el contacto de los fosfolípidos con la fase acuosa entre las membranas, podría existir otro anillo de SP-B asociado a la siguiente membrana (figura 87), y que recogería los fosfolípidos para proseguir con el transporte entre las distintas bicapas, hasta alcanzar finalmente la monocapa interfacial. La asociación de los dos anillos de SP-B de las membranas adyacentes (responsables de los oligómeros observados mediante microscopía) podría ser importante tanto para mediar el acercamiento de las bicapas, como para facilitar el tránsito de los fosfolípidos entre las estructuras. El requerimiento de la presencia de la SP-B en ambos lados de las membranas que se empaquetan para la formación de estructuras multilamelares, apoyan también el posible acoplamiento entre los anillos de SP-B de las diferentes bicapas (Cabre et al., 2009).

Por otro lado, el mecanismo de acción propuesto para los oligómeros de SP-B en cuanto al transporte de fosfolípidos entre las estructuras del surfactante, es también coherente con las estructuras propuestas por Hall y colaboradores. Estas estructuras, promovidas por las proteínas hidrofóbicas, consistirían en intermedios curvados con función de puente para los lípidos entre las bicapas y la monocapa interfacial (Piknova et al., 2002; Rugonyi et al., 2008; Chavarha et al., 2010).



**Figura 87.** Mecanismo de acción propuesto para los complejos oligoméricos de SP-B detectados en el surfactante solubilizado con CHAPS. Los anillos de SP-B podrían encontrarse intercalados entre las bicapas del surfactante o entre la bicapa y la monocapa interfacial. Cada dímero de SP-B sería capaz de atrapar un lípido en su cavidad hidrofóbica, de manera que los complejos favorecerían el transporte de los fosfolípidos entre las diversas estructuras del surfactante.

## **PAPEL DEL SURFACTANTE PULMONAR EN LA DIFUSIÓN DE OXÍGENO A TRAVÉS DEL ALVEOLO**



## **6. PAPEL DEL SURFACTANTE PULMONAR EN LA DIFUSIÓN DE OXÍGENO A TRAVÉS DEL ALVEOLO**

### **6.1. INTRODUCCIÓN**

Dado que la función del pulmón es el intercambio de gases, cabe pensar que la existencia de una película lipoproteica tapizando toda la superficie alveolar, y constituyendo por tanto la primera barrera física que debe atravesar el oxígeno en su paso hacia los capilares pulmonares, no sólo no debería impedir el intercambio de gases sino que además podría haber sido optimizada a lo largo de la evolución para facilitar de alguna manera el transporte del oxígeno a la sangre.

La mayor capacidad de difusión del oxígeno a través de los sistemas lipídicos (Aberg et al., 2010), sugiere que el surfactante pulmonar podría jugar *per se* un papel facilitador de la difusión interfacial de oxígeno, mediante la generación de estructuras en forma de membranas interconectadas y empaquetadas a través de las cuales el oxígeno podría superar más fácilmente la barrera a la difusión que supone la capa acuosa capilar que recubre el epitelio alveolar. Por otro lado, el reciente descubrimiento de la capacidad de los neumocitos tipo II para producir hemoglobina (Bhaskaran et al., 2005; Newton et al., 2006) podría respaldar también la existencia de un posible papel del surfactante relacionado con la facilitación del transporte de oxígeno.

Para obtener información adicional sobre ese posible papel del surfactante se desarrollaron dos aproximaciones cuyos resultados se exponen y discuten en el presente capítulo. En primer lugar se puso a punto un método para evaluar la difusión del oxígeno a través del surfactante pulmonar y de complejos lipídicos y lipoproteicos preparados a partir de sus fracciones, mediante la utilización de una sonda de rutenio cuya fluorescencia es sensible a la concentración de oxígeno.

En segundo lugar se llevó a cabo un estudio del efecto de la exposición de animales modelo a condiciones de hipoxia en la composición y función de su surfactante pulmonar. A partir de este modelo, se analizó la expresión a nivel de mRNA de proteínas relacionadas con la hipoxia (HIF-1 $\alpha$ , HIF,  $\alpha$ -globina y  $\beta$ -globina) y con el surfactante pulmonar (SP-A, SP-B, SP-C, SP-D y ABCA3) en pulmones de ratas control o sometidas a un modelo de hipoxia que supone la exposición a 10% de oxígeno durante 72 horas, analizándose también la variación del contenido de algunas de estas proteínas en los lavados broncoalveolares de los animales. Se llevó a cabo además un estudio comparativo de la función tensioactiva del surfactante pulmonar de ambos tipos de animales mediante ensayos de adsorción interfacial. Por último, para conocer el estado general pulmonar de los animales sometidos a hipoxia, se abordó una caracterización completa del patrón proteómico del pulmón y del lavado broncoalveolar de ambos grupos de ratas.

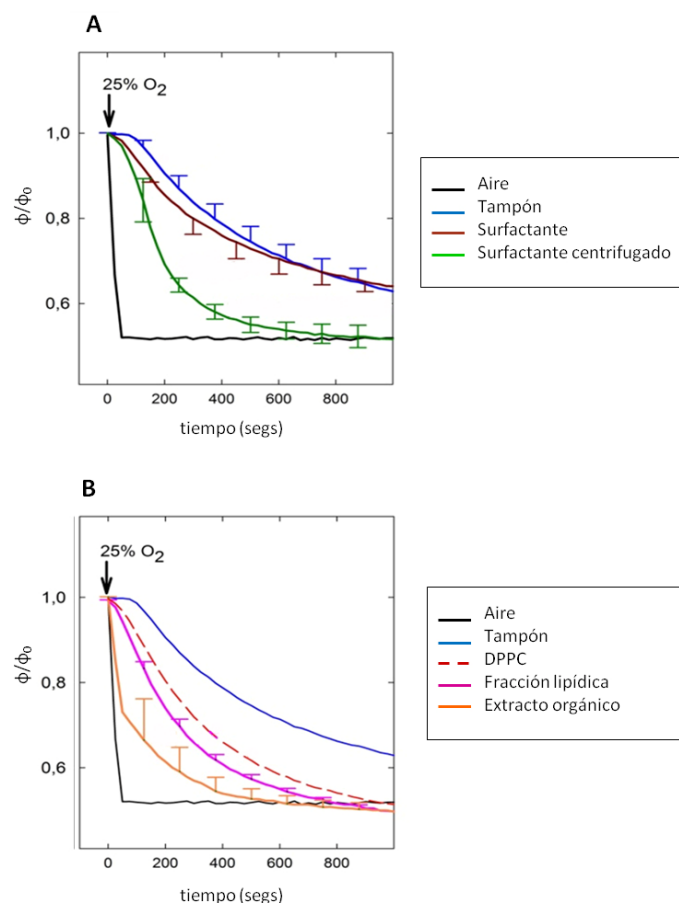
## **6.2. RESULTADOS**

### **6.2.1. Efecto del surfactante pulmonar en la difusión interfacial de oxígeno**

Para analizar la difusión de oxígeno a través de capas interfaciales de surfactante pulmonar o de otros materiales relacionados, se desarrolló un método basado en la utilización de una sonda fluorescente sensible a la concentración de oxígeno tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos de la presente Tesis. Tras colocar la muestra sobre una película de silicona que contiene embebida la sonda de rutenio RDP3 en el fondo de un capilar (ver figura 37A), se estudiaron las cinéticas de decaimiento de la señal de fluorescencia de la sonda como consecuencia del aumento en la concentración de oxígeno cuando se pasa de un flujo de 100% de nitrógeno sobre el capilar (0% de oxígeno) a un flujo de 25% de oxígeno.

En la figura 88 se muestran las cinéticas de difusión de oxígeno a través de las distintas muestras ensayadas. Como se puede observar, el decaimiento de la fluorescencia como consecuencia de la exposición de la sonda a 25% de oxígeno en ausencia de cualquier tipo de muestra (línea negra) se produce de manera prácticamente instantánea. La adición de una capa de 3  $\mu$ l de tampón sobre la película de sonda (línea azul) produce una ralentización notable de la cinética de apagamiento, indicando una difusión más lenta del oxígeno a través de esta capa acuosa. La presencia sobre la sonda de una muestra de 3  $\mu$ l de surfactante pulmonar con una concentración fosfolípídica de 16 mg/ml (línea marrón en A) mostró una cinética de difusión de oxígeno similar a la obtenida a través del tampón sin surfactante. Cabe la posibilidad de que la difusión de oxígeno a través de capas diluidas de surfactante todavía dependa de la difusión del oxígeno a través del disolvente como etapa limitante. La concentración fisiológica de surfactante en la superficie alveolar es difícil de establecer pero se estima que puede estar en torno a 100 mg/ml (Bastacky et al., 1995). Para analizar la difusión de oxígeno a través de capas suficientemente concentradas de surfactante se llevó a cabo una centrifugación del surfactante en el capilar seguida de una eliminación del tampón remanente en el sobrenadante, consiguiendo así aumentar la concentración del surfactante a aproximadamente 27 mg/ml de fosfolípido. Como se observa en la gráfica, el surfactante centrifugado (línea verde en A) permitió una difusión del oxígeno más rápida que la observada a través del mismo volumen de tampón o del propio surfactante sin centrifugar.





**Figura 88.** Cinéticas de difusión de oxígeno a través de tampón o diferentes muestras de surfactante (**A**) o de diversos sistemas lípidicos o lipoproteicos (**B**). La línea negra muestra la disminución instantánea de la diferencia de fase (reducción del tiempo de vida, apagamiento) de la fluorescencia de la sonda cuando sobre ella no hay ningún material.

En la tabla 4 se muestran los valores del coeficiente  $t_{90}$  de las cinéticas, definido como el tiempo necesario para alcanzar el 90% de la señal correspondiente al equilibrio final con 25% de oxígeno. Este parámetro permite comparar la velocidad de difusión del oxígeno a través de las diferentes muestras estudiadas, resultando que la difusión de oxígeno es mucho más rápida a través surfactante centrifugado ( $t_{90} = 8.7 \pm 1.3$  min) que a través del tampón ( $t_{90} = 38.4 \pm 3.1$  min).

| Medio sobre la película de sonda  | $t_{90}$ (min) |
|-----------------------------------|----------------|
| Aire                              | $0.6 \pm 0.1$  |
| Tampón                            | $38.4 \pm 3.1$ |
| Surfactante                       | $23.5 \pm 3.7$ |
| Surfactante centrifugado          | $8.7 \pm 1.3$  |
| DPPC                              | 21.3           |
| Fracción lipídica del surfactante | $14.1 \pm 0.9$ |
| Extracto orgánico de surfactante  | $6.4 \pm 2.4$  |

**Tabla 4.** Valores de  $t_{90}$ , tiempo requerido para alcanzar el 90% de la señal máxima obtenida tras el equilibrio logrado con un 25% de oxígeno, de las distintas muestras ensayadas.

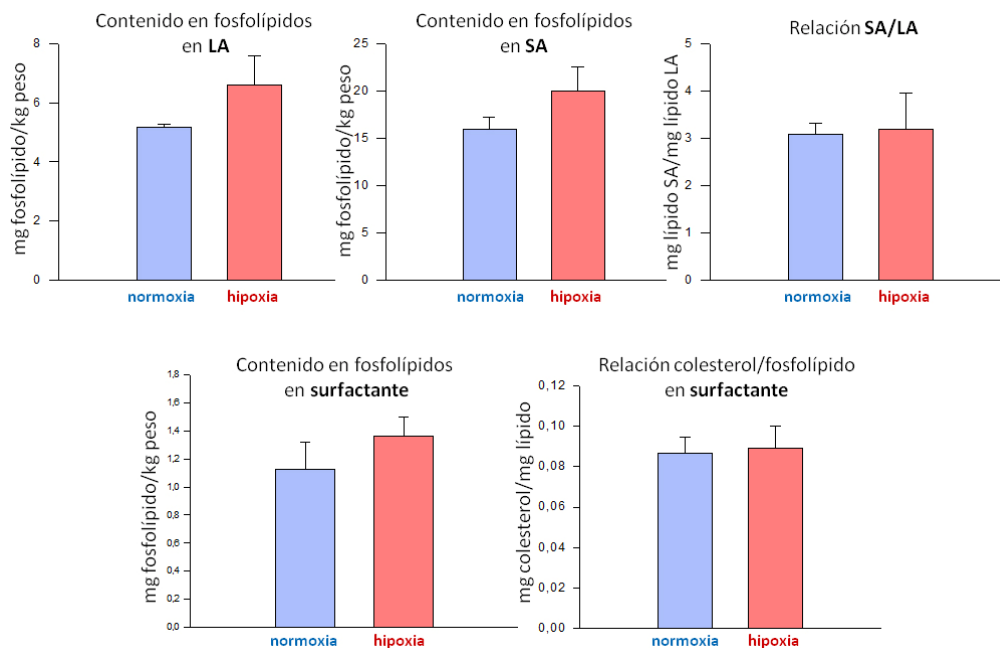
Para comprobar si la difusión facilitada del oxígeno a través del surfactante podría ser fundamentalmente debida a la mayor solubilidad de este gas en sistemas lipídicos, se analizó también la difusión a través de capas puramente lipídicas, como las formadas por el lípido sintético DPPC, la principal especie fosfolipídica del surfactante, o por la fracción lipídica completa del surfactante, ambas reconstituidas en tampón y centrifugadas de la misma manera que el surfactante pulmonar. En la figura **88B** se puede observar cómo, efectivamente, las cinéticas de difusión de oxígeno a través de estos dos sistemas lipídicos son también más rápidas que la difusión a través del tampón acuoso, confirmando que la presencia de membranas en el medio favorece la difusión del oxígeno. Además, tal y como se aprecia en la tabla **4**, la fracción lipídica del surfactante permitió una difusión más eficaz que la observada a través de la DPPC sintética, sugiriendo que la compleja composición lipídica del surfactante puede dar lugar a estructuras que favorecen de alguna manera el transporte del oxígeno, quizá, al menos en parte, gracias a una mayor fluidez y/o un comportamiento más dinámico (Bernardino de la Serna et al., 2009). No obstante, ninguna de las dos preparaciones puramente lipídicas dio lugar a cinéticas tan rápidas como las observadas a través del surfactante nativo. Sin embargo, cuando se ensayó una preparación reconstituida a partir del extracto orgánico de surfactante, que contiene todos los lípidos y las proteínas hidrofóbicas, ésta mostró una cinética de difusión de oxígeno comparable a la del surfactante nativo. Este resultado apunta por lo tanto a un posible papel de las proteínas hidrofóbicas del surfactante en la formación de las estructuras necesarias para facilitar el tránsito de oxígeno a través de la red de membranas que el surfactante forma en el alveolo.

## 6.2.2. Efecto de un modelo de hipoxia en el pulmón y en la composición y función del surfactante pulmonar

### 6.2.2.1. Efecto de la hipoxia en el contenido total de lípido y proteína en lavados broncoalveolares, surfactante pulmonar y sus fracciones

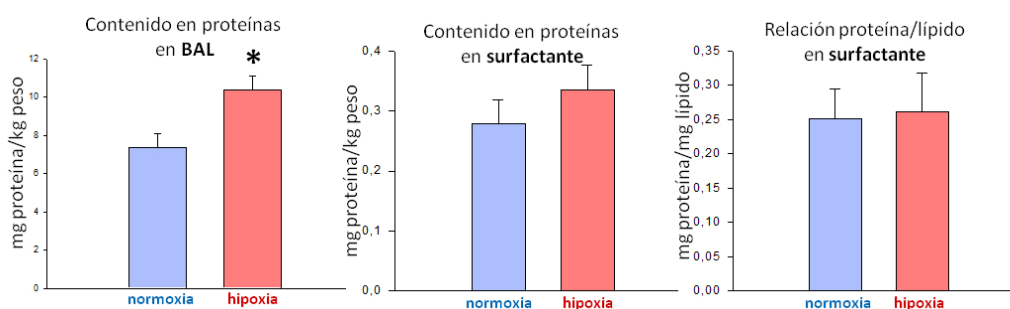
Para estudiar los posibles cambios producidos en el sistema surfactante como consecuencia de la exposición de los animales a hipoxia, se llevó a cabo la determinación del contenido en lípidos y proteínas totales de los lavados broncoalveolares, el surfactante, y los subtipos pesado o de agregados grandes (LA) y ligero o de agregados pequeños (SA) de surfactante, separados por centrifugación diferencial.

Como se muestra en la figura 89, los animales expuestos a hipoxia mostraron una tendencia hacia un mayor contenido en fosfolípidos de surfactante que los animales control, tanto en el surfactante completo como en los LA y SA, aunque los cambios no resultaron ser estadísticamente significativos. Tampoco se detectó diferencia alguna en el contenido en colesterol del surfactante. La proporción de fosfolípido en las fracciones ligera y pesada del surfactante (SA/LA) permaneció similar en ambos grupos de animales, revelando por lo tanto que las ratas hipóxicas mantienen un metabolismo extracelular del surfactante normal.



**Figura 89.** Contenido en lípidos del surfactante pulmonar de ratas control y ratas sometidas a hipoxia, así como en las fracciones que contienen los agregados grandes (LA) y pequeños (SA) del surfactante. Los valores representados son medias con error (n=6 para cada grupo), y no se observan diferencias estadísticamente significativas entre las ratas control y las hipóxicas en ninguno de los parámetros analizados.

En cuanto al contenido en proteínas (figura 90), se encontró un aumento significativo de la cantidad de proteína total en el lavado broncoalveolar de las ratas sometidas a hipoxia en comparación con los animales control. Sin embargo, no aparecieron diferencias significativas ni en el contenido de proteínas ni en la relación proteína/fosfolípido en el surfactante. En cualquier caso, sí se observó una ligera tendencia al aumento de proteína total en el surfactante de las ratas sometidas a hipoxia.

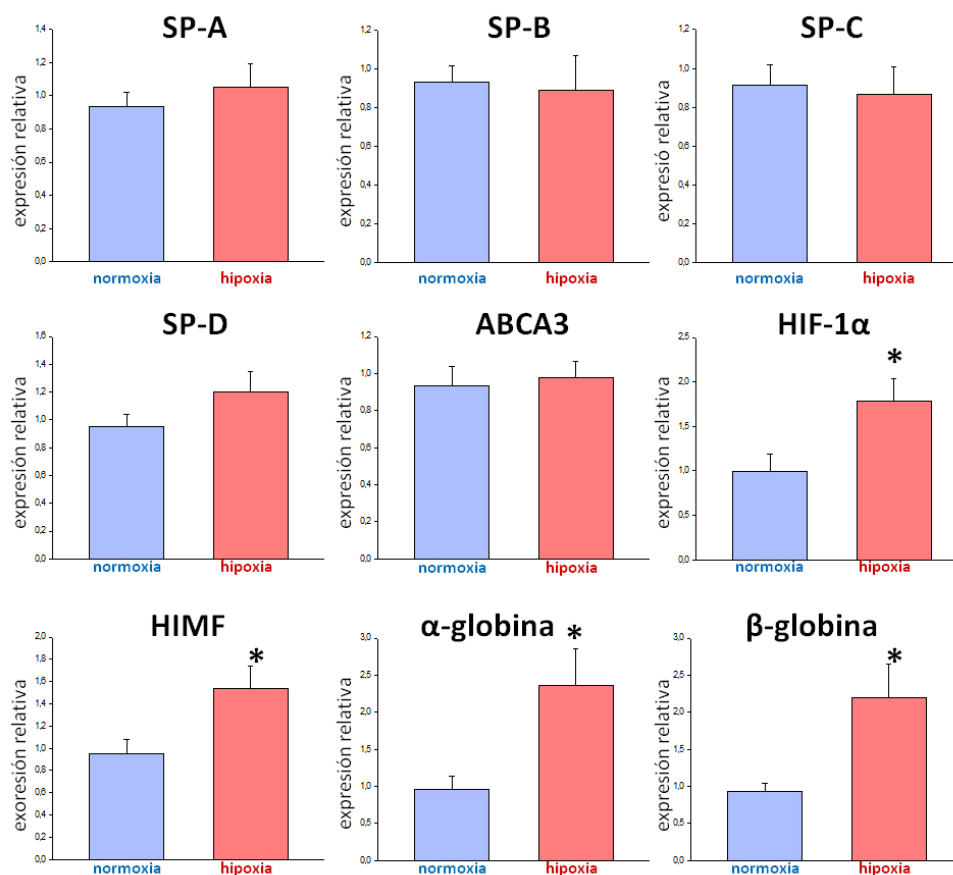


**Figura 90.** Contenido total de proteínas en el surfactante pulmonar y en el lavado broncoalveolar (BAL) de ratas control y ratas sometidas a hipoxia. Los valores representados son medias con error ( $n=6$  para cada grupo) y las diferencias significativas se indican con un asterisco ( $p<0.05$ ).

#### 6.2.2.2. Efecto de la hipoxia en la expresión relativa de los genes estudiados en pulmón

La expresión relativa a nivel de mRNA de nueve proteínas relacionadas con la hipoxia o con el surfactante pulmonar fue determinada mediante PCR a tiempo real: las proteínas del surfactante SP-A, SP-B, SP-C y SP-D, el transportador lipídico ABCA3, los factores inducibles por hipoxia HIF-1 $\alpha$  y HIF-1 $\beta$ , y las dos subunidades de la hemoglobina,  $\alpha$  y  $\beta$ -globinas.

En la figura 91 se comparan los niveles de mRNA de las proteínas indicadas en el tejido pulmonar de ratas sometidas a hipoxia y en el pulmón de las ratas control. Como podría esperarse, los niveles de HIF-1 $\alpha$  y HIF-1 $\beta$  aumentaron significativamente en el pulmón de los animales sometidos a hipoxia, lo que indica que la inducción por la hipoxia de estas proteínas se mantiene aún tras las 72 horas de exposición de los animales a 10% de oxígeno. No obstante, no se encontraron cambios significativos en los niveles de mRNA de las proteínas del surfactante ni del transportador ABCA3. Por último, se encontró un incremento significativo de la expresión de las dos subunidades de la hemoglobina, indicando que esta proteína podría estar implicada en la respuesta del pulmón a la hipoxia.



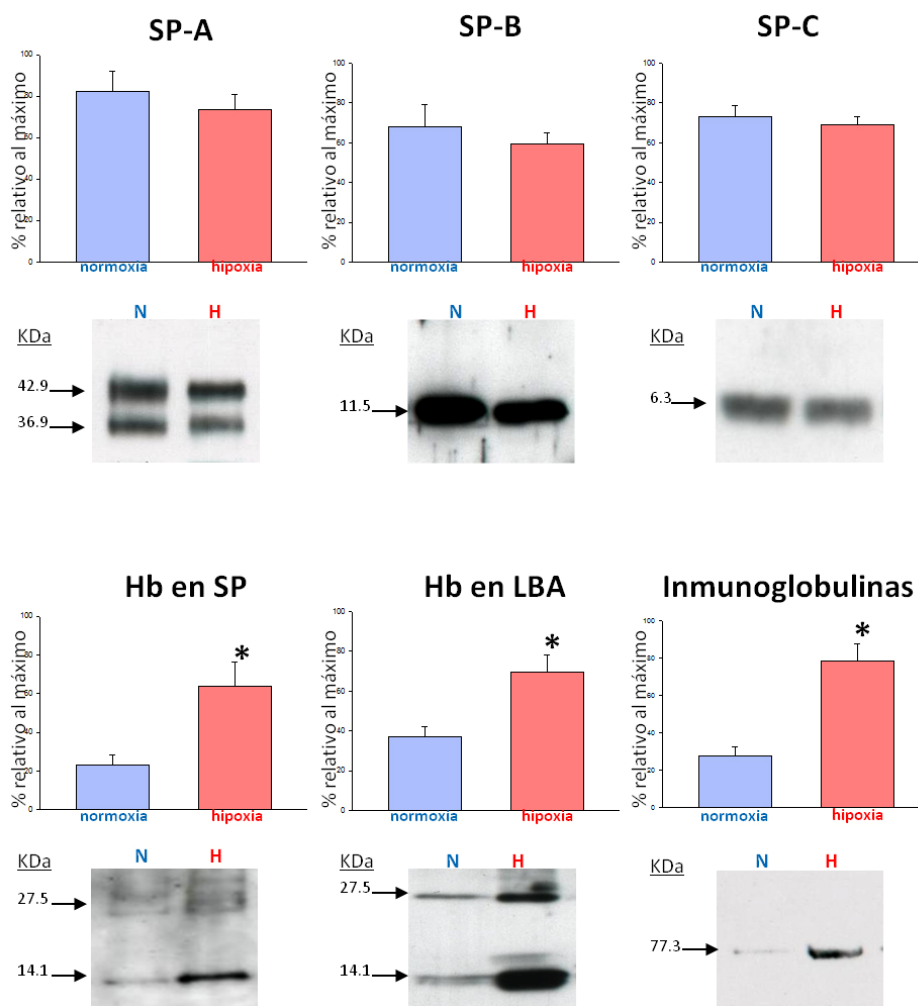
**Figura 91.** Comparación de la expresión relativa de los genes estudiados en pulmón de ratas control e hipóxicas, determinada por RT-PCR. Los valores representados son medias con error (n=6) y las diferencias significativas se indican con un asterisco ( $p < 0.05$ ).

### 6.2.2.3. Efecto de la hipoxia en la composición proteica de los lavados broncoalveolares

Los niveles relativos de varias proteínas en el lavado broncoalveolar de ratas normóxicas e hipóxicas fueron comparados mediante Western blot. Los resultados, mostrados en la figura 92, confirmaron los obtenidos mediante PCR a tiempo real, ya que no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos en el contenido de las proteínas del surfactante SP-A, SP-B y SP-C, pero sí un marcado aumento del contenido en hemoglobina de los lavados broncoalveolares de las ratas sometidas a hipoxia. Además, en estos animales también se observó un aumento de la cantidad de hemoglobina asociada al surfactante pulmonar purificado, encontrándose también una cierta cantidad de esta proteína asociada al surfactante de los animales control.

Finalmente, en todos los Western blots realizados con lavados broncoalveolares se observó la aparición de una banda de 77 kDa, especialmente intensa en las muestras de ratas sometidas a hipoxia. Mediante una inmunodetección con anticuerpo secundario anti-IgG se concluyó que la banda se debe a la presencia de inmunoglobulinas en las

muestras, y que el contenido en esta proteína es significativamente mayor en los lavados procedentes de ratas hipóxicas.

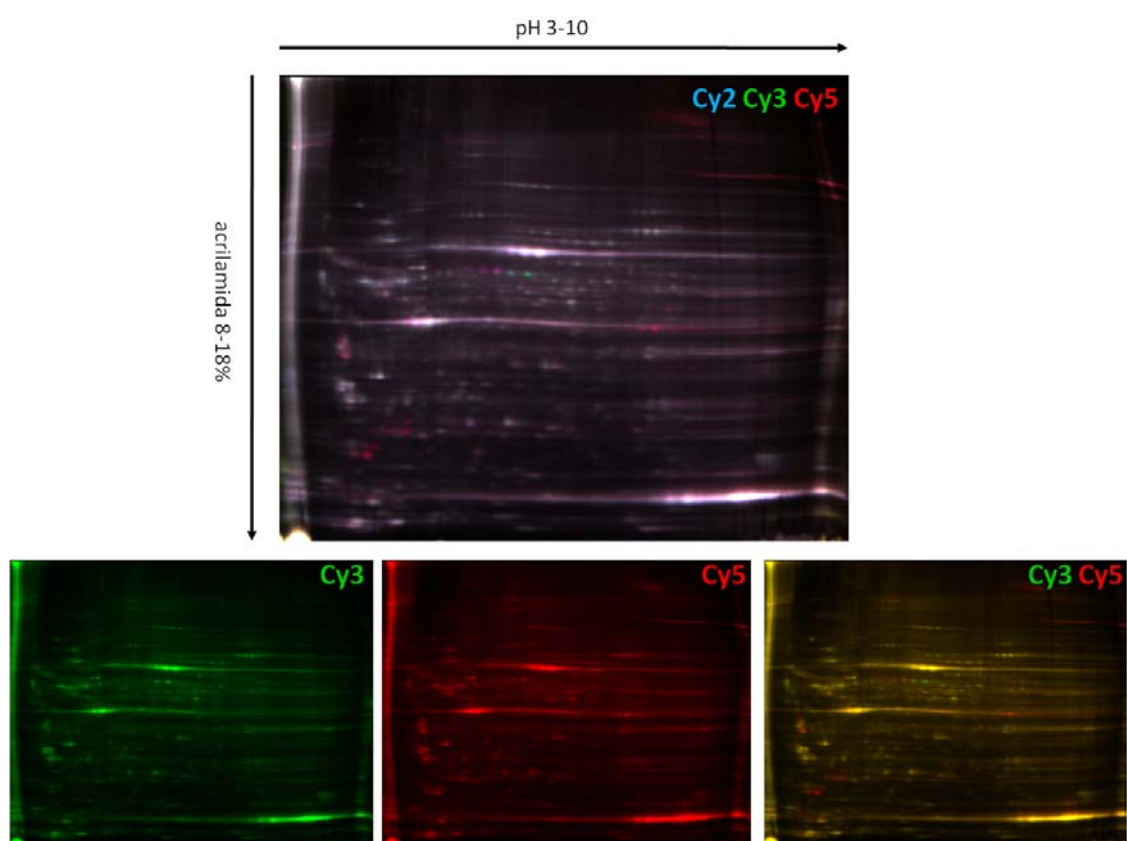


**Figura 92.** Comparación del contenido relativo de algunas proteínas en lavado broncoalveolar (LBA) de animales control y sometidos a hipoxia, determinado mediante Western blot. También se muestra la determinación mediante Western blot del contenido en hemoglobina del surfactante (SP). Los valores representados son medias con error (muestras de 6 ratas por grupo, datos obtenidos mediante densitometrado de 4 geles). Las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) se indican con un asterisco.

#### **6.2.2.4. Efecto de la hipoxia en el perfil proteómico de los lavados broncoalveolares y del tejido pulmonar**

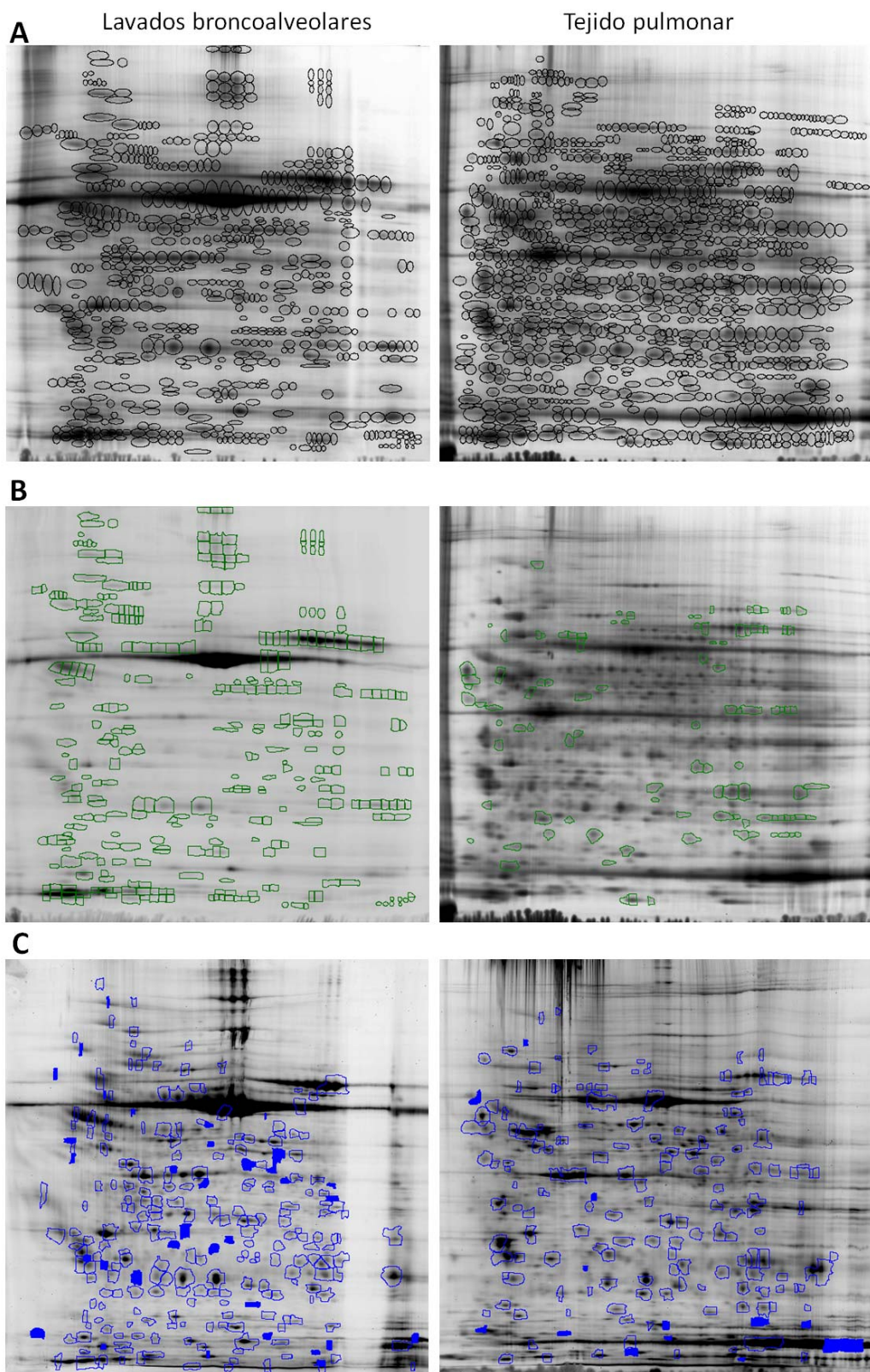
Además del estudio mediante Western blot de los niveles de algunas de las proteínas más interesantes desde el punto de vista del surfactante pulmonar, se realizaron dos experimentos de 2D-DIGE, uno con los lavados broncoalveolares y otro con tejido pulmonar, para comparar el perfil proteómico completo de los dos grupos de animales.

Para llevar a cabo cada experimento se desarrollaron 6 electroforesis bidimensionales, cada una de las cuales consistió en un electroenfoque en un gradiente no lineal de pH entre 3 y 10, y una segunda dimensión en condiciones desnaturizantes y reductoras en geles en gradiente de 8-18% de acrilamida. En cada electroforesis se cargó una mezcla constituida por 1 muestra de hipoxia (marcada con Cy3 o Cy5), 1 muestra control (marcada con Cy5 o Cy3) y una mezcla de ambas (marcada con Cy2) que constituye el estándar interno del experimento. En experimentos paralelos, se cargaron además los 6 pools en 6 geles sin sondas para su análisis por espectrometría de masas. En la figura 93 se muestra un ejemplo de las imágenes obtenidas de un gel en el que se cargaron muestras de homogeneizado de pulmón. En este caso la muestra procedente de la rata control se marcó con Cy5 y la de la rata sometida a hipoxia con Cy3. En las imágenes tomadas a las distintas longitudes de onda de emisión de las sondas empleadas se pueden observar las diferencias entre las muestras, que se revelan como puntos de diferente color tras el solapamiento de las distintas imágenes.



**Figura 93.** Imágenes recogidas tras el escaneado de un gel DIGE, en el que se cargaron muestras de homogeneizado de pulmón, a las diferentes longitudes de onda de emisión de las sondas Cy2 (pool), Cy3 (hipoxia) y Cy5 (control). La imagen superior muestra la emisión de las 3 sondas juntas, mientras que las inferiores corresponden a la fluorescencia de Cy3 en verde, Cy5 en rojo y la combinación de ambas fluorescencias.





**Figura 94.** Imágenes de los geles de referencia de los experimentos DIGE con material de lavados broncoalveolares y de tejido pulmonar. En **A** se señalan los puntos que fueron seleccionados para llevar a cabo el análisis estadístico de las diferencias entre animales control y sometidos a hipoxia, en **B** los puntos que mostraron diferencias significativas, y en **C** los puntos que se recogieron del *picking gel* para su identificación por espectrometría de masas.



En la figura **94** se muestran las imágenes de los geles de referencia de los experimentos realizados, indicando los puntos que fueron seleccionados para llevar a cabo el análisis estadístico ANOVA (**A**) y los puntos en los que se detectaron diferencias significativas entre los dos grupos de animales ( $p < 0.05$ ) (**B**). En las muestras de los lavados broncoalveolares, se analizaron 657 puntos de los cuales 335 mostraron diferencias significativas, y en los experimentos con el tejido pulmonar se analizaron 1100 puntos, mostrando 105 de ellos cambios significativos. Por último en la figura **94C** se muestran los puntos que fueron recogidos del gel desarrollado con muestras sin marcaje con sondas fluorescentes (*picking gel*) para su análisis mediante espectrometría de masas (249 puntos en el experimento de los lavados alveolares y 170 puntos en el de tejido pulmonar).

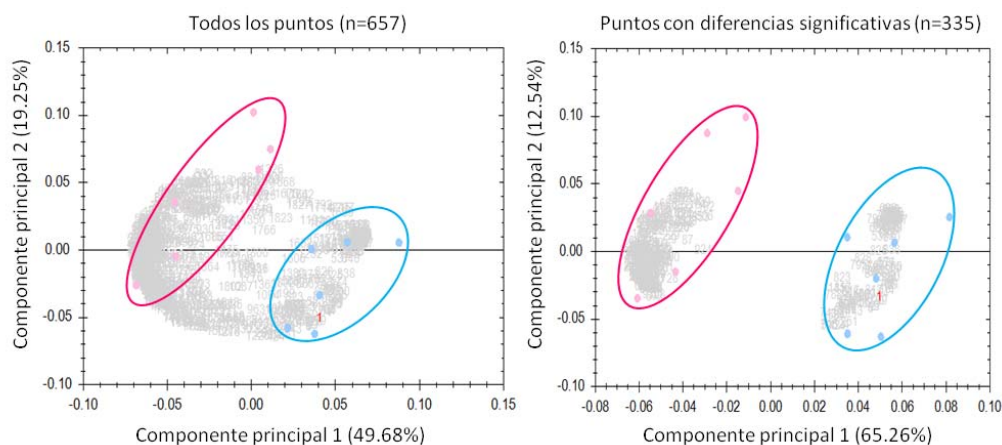
Una vez identificadas las proteínas, se sumaron los volúmenes normalizados de todos los puntos de cada proteína para cada animal, y se calculó la media y desviación estándar de cada proteína por grupo. La comparación de las proteínas entre los grupos se realizó con estos datos mediante un análisis *t-test*, indicándose en las figuras **96** y **97** y en las tablas **5** y **7** cuáles de las proteínas mostraron cambios significativos ( $p < 0.05$ ).

En las tablas **6** y **8** se muestra el porcentaje de cambio de las proteínas con diferencias significativas en el grupo de animales sometidos a hipoxia con respecto a los animales control. Éste fue calculado a partir de la diferencia entre la suma de los volúmenes normalizados de la proteína en cuestión en el grupo de hipoxia y la del grupo control, y considerando como 100% la suma de volúmenes de la proteína del grupo control. Es decir, se considera un 50% de cambio cuando los niveles de la proteína aumentaron o disminuyeron 1.5 veces con respecto al grupo de animales control.

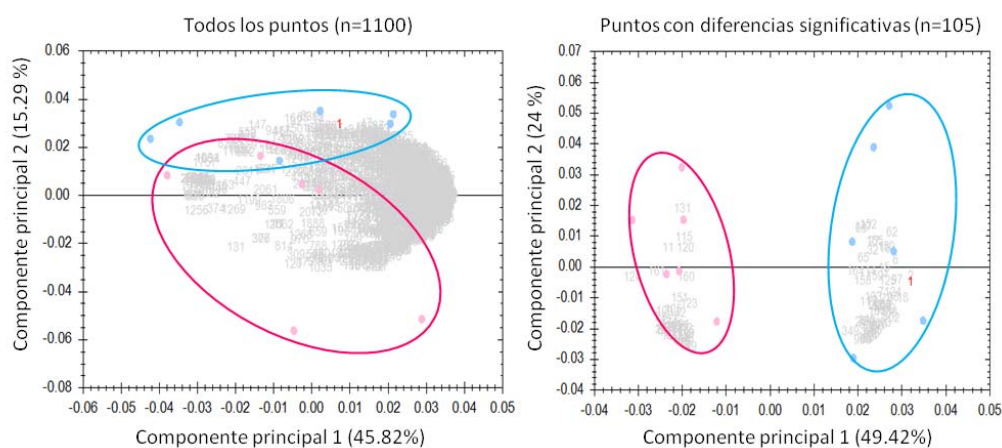
Por otro lado se realizó una comparación de las proteínas entre los grupos en cuanto al porcentaje de cada una de ellas con respecto al componente proteómico total. Para ello se tomó como 100% la suma de los volúmenes normalizados de todas las proteínas en cada animal, y se calculó el porcentaje con respecto a este valor de cada una de las proteínas en cada animal. Finalmente se realizó la media de todos los animales de cada grupo para cada proteína. Estos resultados se muestran en las figuras que se incluyen en el **anexo I** de esta Tesis, como información adicional que podría resultar de utilidad para posteriores estudios de algunas proteínas que puedan ser consideradas de interés.

Por último, se realizó un análisis estadístico multivariante de los componentes principales (PCA) para cada experimento (lavados broncoalveolares y tejido). Este análisis muestra una clara separación de los datos correspondientes a los grupos control e hipoxia en ambos casos, principalmente en el análisis de los puntos con diferencias significativas (figura **95**), lo que indica que las condiciones seleccionadas para definir el modelo realmente establecen una respuesta fisiológica diferencial, manifestada en la adaptación del componente proteómico.

### A. Lavados broncoalveolares



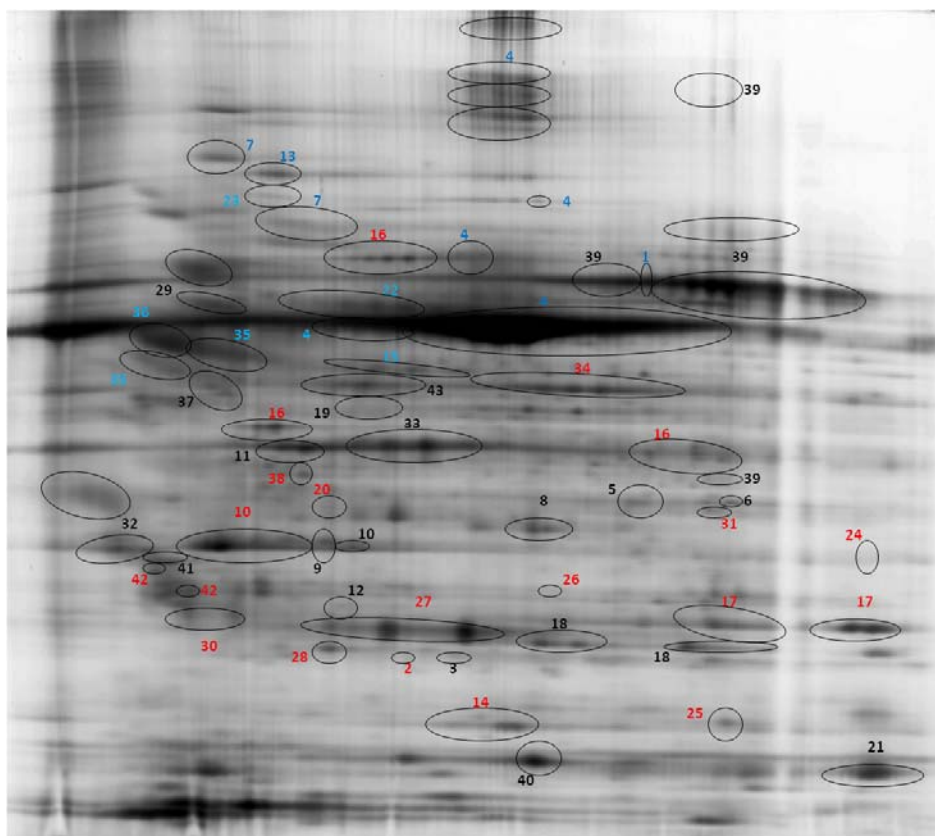
### B. Tejido pulmonar



**Figura 95.** Análisis de componentes principales (PCA) a partir de los datos obtenidos en los experimentos de proteómica. Los puntos representan los 6 animales estudiados en cada grupo: control (azul) e hipoxia (rosa).

### Cambios en el perfil proteómico de los lavados broncoalveolares de ratas sometidas a hipoxia

En la figura 96 se muestra un gel ilustrativo del experimento realizado a partir de muestras de los lavados broncoalveolares, indicándose los puntos que fueron identificados por espectrometría de masas. Los 213 puntos examinados permitieron identificar las 41 proteínas que se enumeran en la tabla 5, cuyos números identificativos han sido también consignados en el gel de la figura 96. En la tabla 5 aparecen además dos proteínas (marcadas con un asterisco) que habían sido identificadas previamente en el laboratorio donde se realizaron estos experimentos, en muestras de lavado broncoalveolar de rata.



**Figura 96.** Gel de referencia de las proteínas identificadas por espectrometría de masas en las muestras de lavado broncoalveolar. La primera dimensión se desarrolló en condiciones de pH entre 3-10 y la segunda dimensión en geles en gradiente de acrilamida entre 8-18%. La numeración corresponde a la lista de proteínas de la tabla 5. Las proteínas con diferencias significativas al comparar los datos de animales sometidos a hipoxia y animales control, aparecen numeradas en color: en rojo aquellas que aparecen en cantidad significativamente menor en las muestras de ratas sometidas a hipoxia, y en azul las que aparecen en cantidad significativamente mayor en este grupo de animales.

De las proteínas identificadas, 25 mostraron diferencias significativas al comparar los grupos (58% del total), correspondiendo 16 de ellas (37%) a proteínas que aumentaron su presencia en hipoxia (numeradas en azul en la figura) y 9 (21%) a proteínas con presencia significativamente reducida en este grupo (en rojo).

Para mostrar la magnitud del cambio en la expresión de las proteínas que muestran diferencias significativas entre los grupos, en la tabla 6 se muestra el porcentaje de cambio de estas proteínas, correspondiendo los valores negativos a la reducción de la presencia de la proteína en cuestión en los animales sometidos a hipoxia. Como se puede observar en la tabla, se han identificado 4 proteínas que muestran niveles diferentes en las ratas hipóxicas de al menos 1,5 veces con respecto a las ratas control (> 50% de cambio): la ceruloplasmina y la cadena pesada del inhibidor de tripsina *inter-alpha-inhibitor H4* (niveles elevados) y la haptoglobina y la proteína con dominio alfa/beta hidrolasa *abhydrolase domain containing 14b* (niveles reducidos).

En cuanto a las subunidades de la hemoglobina, resultó digno de mención que no se detectó la  $\alpha$ -globina en los geles, aunque sí se identificaron varios puntos como  $\beta$ -globina (número 21 en la figura 96) con una masa molecular de 16 kDa y puntos isoeléctricos de alrededor de 7.8.

| <u>Número (ver fig. 96)</u> | <u>Nombre de la proteína</u>                                                             | <u>Número de identificación</u> |
|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| 1                           | Aa2-001                                                                                  | gil33086498                     |
| 2                           | Abhydrolase domain containing 14b                                                        | gil56090461                     |
| 3                           | Adenine phosphoribosyl transferase                                                       | gil61556832                     |
| 4                           | Albumin                                                                                  | gil158138568                    |
| 5                           | Aldehyde reductase 1                                                                     | gil6978491                      |
| 6                           | Aldo-keto reductase family 1, member A1 (aldehyde reductase)                             | gil13591894                     |
| 7                           | Alpha-1-inhibitor III precursor (Murinoglobulin 1)                                       | gil202577                       |
| 8                           | Annexin A3 (Lipocortin III)                                                              | gil122065130                    |
| 9                           | Annexin A4                                                                               | gil55742832                     |
| 10                          | Annexin A5 (Lipocortin V)                                                                | gil6978505                      |
| 11                          | Beta-actin FE-3                                                                          | gil13516471                     |
| 12                          | Calpain small subunit                                                                    | gil1794205                      |
| 13                          | Ceruloplasmin                                                                            | gil6978695                      |
| 14                          | Cu/Zn superoxide dismutase                                                               | gil1213217                      |
| 15                          | Fetuin beta                                                                              | gil17865327                     |
| 16                          | Gelsolin                                                                                 | gil51854227                     |
| 17                          | Glutathione S-transferase Y-b subunit (EC 2.5.1.18)                                      | gil204499                       |
| 18                          | Glutathione S-transferase, alpha 4                                                       | gil157820217                    |
| 19                          | Guanine deaminase                                                                        | gil148747414                    |
| 20                          | Haptoglobin                                                                              | gil60097941                     |
| 21                          | Hemoglobin beta chain complex                                                            | gil17985949                     |
| 22                          | Hemopexin                                                                                | gil16758014                     |
| 23                          | Inter-alpha-inhibitor H4 heavy chain                                                     | gil126722991                    |
| 24                          | Lipocortin I                                                                             | gil235879                       |
| 25                          | Protein expressed in non-metastatic cells 2 (NM23B)                                      | gil55926145                     |
| 26                          | Pcyt2 protein                                                                            | gil50925459                     |
| 27                          | Peroxiredoxin 6                                                                          | gil16758348                     |
| 28                          | Phosphatidylethanolamine binding protein                                                 | gil8393910                      |
| 29                          | Polymeric immunoglobulin receptor (PIGR)                                                 | gil27151742                     |
| 30 (*)                      | Protein Plunc (Palate lung & nasal epithelium clone protein)                             | gil21666384                     |
| 31                          | Protein RAKc                                                                             | gil741804                       |
| 32 (*)                      | Pulmonary surfactant-associated protein A precursor (SP-A) (PSP-A) (PSAP)                | gil24773                        |
| 33                          | SEC14-like 2                                                                             | gil60097947                     |
| 34                          | Selenium binding protein 1                                                               | gil18266692                     |
| 35                          | Serine protease inhibitor 1                                                              | gil207042                       |
| 36                          | Serine protease inhibitor 2b                                                             | gil6981576                      |
| 37                          | Serine protease inhibitor alpha 1                                                        | gil51036655                     |
| 38                          | Similar to SPI6                                                                          | gil56090431                     |
| 39                          | Transferrin                                                                              | gil61556986                     |
| 40                          | Transthyretin                                                                            | gil6981684                      |
| 41                          | Tropomyosin 5; TM-5                                                                      | gil9653293                      |
| 42                          | Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta polypeptide | gil9507243                      |
| 43                          | Vitamin D binding protein (Group specific component)                                     | gil203927                       |

**Tabla 5.** Proteínas identificadas a partir de los geles de muestras de lavado broncoalveolar de rata (figura 96). Los números en rojo corresponden a proteínas cuya presencia se reduce significativamente en hipoxia, mientras que los azules corresponden a proteínas con niveles significativamente mayores. Las proteínas que aparecen señaladas con un asterisco son aquellas que no han sido identificadas por espectrometría de masas sino que habían sido ya previamente identificadas en el laboratorio en otros geles DIGE de muestras de lavado broncoalveolar de rata.

| <u>Número (ver fig. 96)</u>         | <u>Nombre de la proteína</u>                                                             | <u>% cambio</u> |
|-------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| <b>Aumentos significativos</b>      |                                                                                          |                 |
| 13                                  | Ceruloplasmin                                                                            | 134,7           |
| 23                                  | Inter-alpha-inhibitor H4 heavy chain                                                     | 116,3           |
| 36                                  | Serine protease inhibitor 2b                                                             | 41,4            |
| 35                                  | Serine protease inhibitor 1                                                              | 30,3            |
| 15                                  | Fetuin beta                                                                              | 27,4            |
| 4                                   | Albumin                                                                                  | 23,8            |
| 1                                   | Aa2-001                                                                                  | 22,4            |
| 22                                  | Hemopexin                                                                                | 22,2            |
| <b>Disminuciones significativas</b> |                                                                                          |                 |
| 20                                  | Haptoglobin                                                                              | -52,7           |
| 2                                   | Abhydrolase domain containing 14b                                                        | -50,7           |
| 24                                  | Lipocortin I                                                                             | -48,7           |
| 31                                  | Protein RAKc                                                                             | -46,8           |
| 14                                  | Cu/Zn superoxide dismutase                                                               | -45,5           |
| 25                                  | Non-metastatic cells 2, protein (NM23B) expressed in                                     | -44,6           |
| 28                                  | Phosphatidylethanolamine binding protein                                                 | -44,2           |
| 17                                  | Glutathione S-transferase Y-b subunit (EC 2.5.1.18)                                      | -43,6           |
| 38                                  | Similar to SPI6                                                                          | -39,3           |
| 34                                  | Selenium binding protein 1                                                               | -38,6           |
| 16                                  | Gelsolin                                                                                 | -37,5           |
| 30                                  | Protein Plunc (Palate lung & nasal epithelium clone protein)                             | -36,1           |
| 10                                  | Annexin A5 (Lipocortin V)                                                                | -35,6           |
| 27                                  | Peroxiredoxin 6                                                                          | -35,2           |
| 42                                  | Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta polypeptide | -34,1           |
| 26                                  | Pcyt2 protein                                                                            | -31,1           |

**Tabla 6.** Porcentaje de cambio de las proteínas identificadas en lavado broncoalveolar cuyos niveles se alteran significativamente en los animales sometidos a hipoxia con respecto a los animales control. Los valores negativos indican porcentaje de disminución en los animales sometidos a hipoxia.

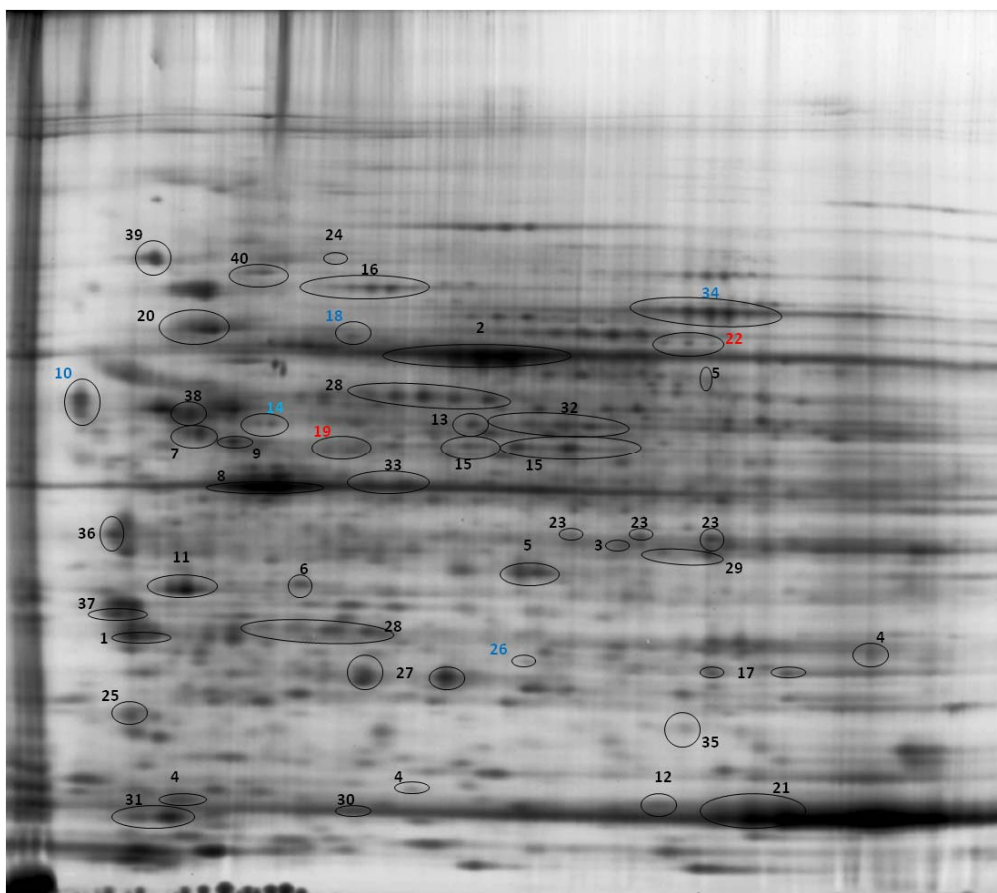
### Cambios en el perfil proteómico del pulmón de ratas sometidas a hipoxia

En la figura 97 se muestra el gel de referencia del experimento realizado con homogeneizados de pulmón, mostrando los 106 puntos que fueron identificados por espectrometría de masas, y que correspondieron a las 40 proteínas que se enumeran en la tabla 7. De ellas, 16 coincidieron con proteínas ya identificadas en las muestras de lavado broncoalveolar. A diferencia del experimento anterior, sólo 7 de las proteínas identificadas (17,5%) mostraron diferencias significativas en los niveles en que aparecen en el tejido de ratas hipóxicas con respecto a las normóxicas, y de ellas, 5 aparecieron en cantidad significativamente mayor (en azul), y 2 en niveles significativamente reducidos (en rojo).

Tal y como se muestra en la tabla 8, además del reducido número de proteínas que mostraron cambios significativos en tejido, el porcentaje de cambio de éstas fue también limitado, ya que ninguna de ellas alteró sus niveles al menos 1,5 veces con respecto al grupo control.

A diferencia de las muestras de lavado, en el tejido pulmonar se identificaron varias isoformas de  $\alpha$ -globina (puntos numerados como 4 en la figura 97): una isoforma dimérica de 27 kDa y punto isoeléctrico 8.4, y dos isoformas monoméricas de 17 kDa y

puntos isoeléctricos 5 y 6. En cuanto a la  $\beta$ -globina, ésta se identificó en varios puntos con una masa de 16 kDa y puntos isoeléctricos entre 6.7 y 7.8.



**Figura 97.** Gel de referencia de las proteínas identificadas por espectrometría de masas en las muestras de homogeneizado de pulmón de rata. La primera dimensión se desarrolló en condiciones de pH entre 3-10 y la segunda dimensión en geles en gradiente de acrilamida entre 8-18%. La numeración corresponde a la lista de proteínas de la tabla 7. Las proteínas con diferencias significativas al comparar los datos de animales sometidos a hipoxia y animales control, aparecen numeradas en color: en rojo aquellas que aparecen en cantidad significativamente menor en las muestras de ratas sometidas a hipoxia, y en azul las que aparecen en cantidad significativamente mayor en este grupo de animales.



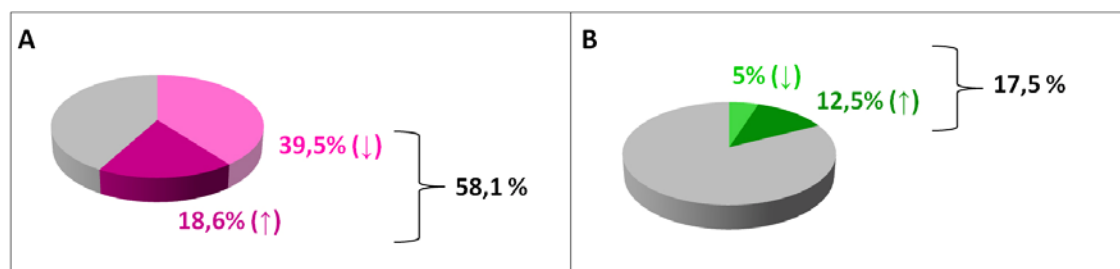
| Número (ver fig. 97) | Nombre de la proteína                                                  | Número de identificación |
|----------------------|------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| 1                    | 14-3-3 zeta isoform                                                    | gi 1051270               |
| 2                    | Albumin                                                                | gi 158138568             |
| 3                    | Aldehyde reductase 1                                                   | gi 6978491               |
| 4                    | Alpha-globin (Hemoglobin alpha 2 chain)                                | gi 30027750              |
| 5                    | Annexin A3 (Annexin-3) (Annexin III) (Lipocortin III)                  | gi 122065130             |
| 6                    | Annexin A4                                                             | gi 55742832              |
| 7                    | ATP synthase beta subunit                                              | gi 1374715               |
| 8                    | Beta-actin FE-3                                                        | gi 13516471              |
| 9                    | CaBP1                                                                  | gi 488838                |
| 10                   | Calreticulin                                                           | gi 11693172              |
| 11                   | Chain A, Annexin V Complex With HeparinOligosaccharides (Lipocortin V) | gi 14488466              |
| 12                   | Cytochrome c oxidase subunit VIa (85 AA)                               | gi 818021                |
| 13                   | Cytokeratin-8                                                          | gi 30352203              |
| 14                   | Desmin                                                                 | gi 38197676              |
| 15                   | Enolase 1, alpha non-neuron                                            | gi 59808815              |
| 16                   | Gelsolin                                                               | gi 51854227              |
| 17                   | Glutathione S-transferase, mu 2                                        | gi 28933457              |
| 18                   | Grp75 (Mortalin) (Heat shock protein 9)                                | gi 1000439               |
| 19                   | Guanine deaminase                                                      | gi 148747414             |
| 20                   | Heat shock protein 5                                                   | gi 25742763              |
| 21                   | Hemoglobin beta chain complex (Beta-1-globin)                          | gi 17985949              |
| 22                   | Lamin-A                                                                | gi 1346413               |
| 23                   | Lipocortin I                                                           | gi 235879                |
| 24                   | Major vault protein                                                    | gi 41055865              |
| 25                   | Myosin regulatory light chain 2 (clone YU63), brain                    | gi 1363305               |
| 26                   | Peroxiredoxin 4                                                        | gi 16758274              |
| 27                   | Peroxiredoxin 6                                                        | gi 16758348              |
| 28                   | Protease (prosome, macropain) 28 subunit, alpha                        | gi 61098214              |
| 29                   | Protein RAKc                                                           | gi 741804                |
| 30                   | S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)                        | gi 16758672              |
| 31                   | Secretoglobin, family 1A, member 1 (uteroglobin)                       | gi 6981694               |
| 32                   | Selenium binding protein 1                                             | gi 18266692              |
| 33                   | Similar to SEC14-like protein 3 (45 kDasecretory protein) (rsec45)     | gi 62660728              |
| 34                   | Transferrin                                                            | gi 61556986              |
| 35                   | Transgelin                                                             | gi 13928744              |
| 36                   | Tropomyosin 2                                                          | gi 66730475              |
| 37                   | Tropomyosin 4                                                          | gi 6981672               |
| 38                   | Tubulin, beta 2c                                                       | gi 40018568              |
| 39                   | Tumor rejection antigen gp96                                           | gi 58865966              |
| 40                   | Valosin-containing protein                                             | gi 17865351              |

**Tabla 7.** Proteínas identificadas a partir de los geles de muestras de homogeneizado de pulmón de rata (figura 97). Los números en rojo corresponden a proteínas cuya presencia se reduce significativamente en hipoxia, mientras que los azules corresponden a proteínas con niveles significativamente mayores.

| Número (ver fig. 97)                | Nombre de la proteína                   | % cambio |
|-------------------------------------|-----------------------------------------|----------|
| <b>Aumentos significativos</b>      |                                         |          |
| 18                                  | Grp75 (Mortalin) (Heat shock protein 9) | 31,4     |
| 14                                  | Desmin                                  | 31,1     |
| 26                                  | Peroxiredoxin 4                         | 26,6     |
| 34                                  | Transferrin                             | 25,3     |
| 10                                  | Calreticulin                            | 23,6     |
| <b>Disminuciones significativas</b> |                                         |          |
| 22                                  | Lamin-A                                 | -18,5    |
| 19                                  | Guanine deaminase                       | -15,7    |

**Tabla 8.** Porcentaje de cambio de las proteínas identificadas en homogeneizado de pulmón, cuyos niveles se alteran significativamente en los animales expuestos a hipoxia con respecto a los animales control. Los valores negativos indican porcentaje de disminución en los animales sometidos a hipoxia.

Por último, en la figura 98 se muestra un diagrama en el que se compara la proporción de proteínas cuyo nivel se altera significativamente cuando se comparan muestras de animales en hipoxia y de animales control, tanto para el lavado broncoalveolar como para el tejido pulmonar. Destaca la acumulación en el lavado de proteínas cuyos niveles resultan sustancialmente afectados como consecuencia de la hipoxia, lo que indica que es en los espacios alveolares donde se manifiestan los procesos fisiológicos adaptativos en respuesta a la diferente disponibilidad de oxígeno.



**Figura 98.** Diagrama en el que se muestra el porcentaje de proteínas con alteraciones significativas en cuanto a sus niveles en lavado broncoalveolar (A) y tejido pulmonar (B). La proporción de proteínas cuyos niveles se reducen significativamente en hipoxia se indica en color claro y aquellas cuyo nivel se incrementa, en oscuro.

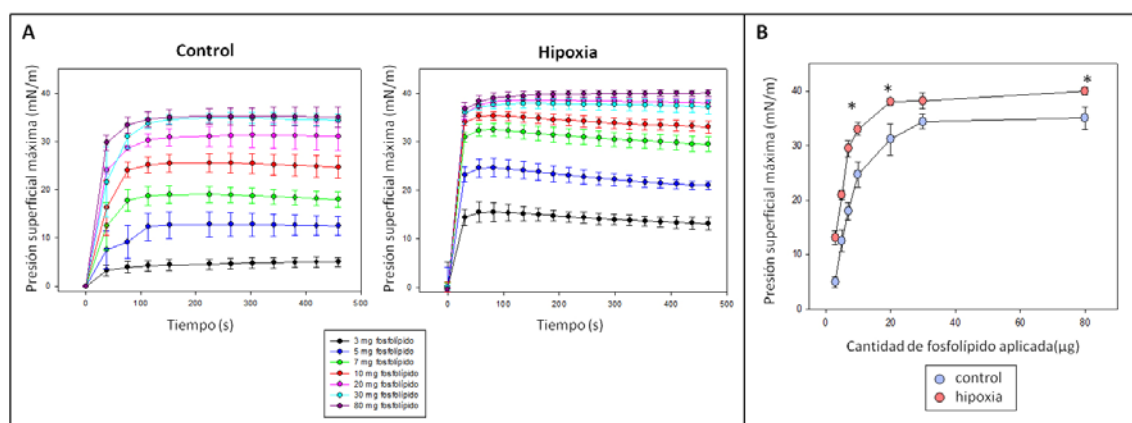
#### 6.2.2.5. Efecto de la hipoxia en la adsorción interfacial del surfactante pulmonar

Se ha determinado en diversos estudios que el incremento del contenido en proteínas que aparece en el lavado broncoalveolar como consecuencia de procesos proinflamatorios que acompañan muchas veces a una alteración de la barrera alveolo-capilar se manifiesta en una alteración de la función tensioactiva del surfactante, fundamentalmente a nivel de una reducción de la capacidad del surfactante para formar películas interfaciales (Meyer y Zimmerman, 2002; Zuo et al., 2008). En este sentido, diferentes proteínas, muchas de ellas plasmáticas, resultan inhibir la adsorción del surfactante mediante mecanismos que, en gran parte de los casos, están todavía por establecer (Warriner et al., 2002). Las alteraciones detectadas como consecuencia de la exposición de los animales a hipoxia incluyen un aparente incremento de la proporción de proteína en los lavados alveolares. Para determinar hasta qué punto los cambios inducidos por la hipoxia en el complemento proteómico del espacio alveolar alteran la función del surfactante, y muy especialmente su capacidad para adsorberse en la interfase aire-líquido, se comparó la capacidad del surfactante obtenido de ratas expuestas a hipoxia y de ratas control para formar rápidamente películas tensioactivas, una vez depositado sobre la interfase.

En estos experimentos de *spreading*, las muestras se depositaron directamente en la interfase aire/líquido de una subfase acuosa tamponada y se siguió a lo largo del tiempo el aumento de la presión superficial producido por la adsorción y extensión del material a lo largo de la interfase hasta llegar a un detector de tensión superficial.



En la figura 99 se muestran las cinéticas  $\pi$ -t de adsorción interfacial de diferentes cantidades de surfactante de ambos grupos de animales según se depositan en la interfase. El surfactante de las ratas expuestas a condiciones hipóxicas no presenta peor actividad de adsorción interfacial que el surfactante de los animales control. Antes bien, incluso se necesita una menor cantidad del surfactante procedente de ratas hipóxicas que del surfactante procedente de las ratas control, para alcanzar la presión superficial de equilibrio, lo que sugiere una función relativamente más eficiente del surfactante de las ratas hipóxicas.



**Figura 99. A.** Cinéticas  $\pi$ -t de distintas cantidades de surfactante obtenido de ratas control y ratas expuestas a hipoxia. **B.** Presiones superficiales máximas logradas por extensión de cantidades crecientes de surfactante pulmonar de ratas control e hipóxicas. Las diferencias significativas se indican con un asterisco ( $p < 0.05$ ).

## 6.3. DISCUSIÓN

### Efecto del surfactante pulmonar en la difusión interfacial de oxígeno

Los resultados obtenidos en los ensayos de difusión de oxígeno a través de una capa de agua mostraron que la existencia de dicho medio supone un impedimento para el paso del oxígeno, y dado que las cinéticas fueron similares independientemente del volumen de agua (entre 1 y 5  $\mu$ l) depositado en el capilar, cabe suponer que la etapa limitante en esta difusión es la partición del oxígeno desde la fase gaseosa a la acuosa.

Como podría esperarse, la difusión del oxígeno a través de los diferentes sistemas de membranas lipídicas evaluadas, sintéticos o naturales, en ausencia o presencia de proteínas, se produjo en todos los casos con cinéticas más rápidas que las obtenidas a través de una pura fase acuosa. Estos resultados podrían sugerir que la mayor solubilidad del oxígeno en las estructuras lipídicas con respecto al agua (Battino et al., 1968; Aberg et al., 2010), podría facilitar la difusión de oxígeno en presencia de una densidad suficiente de membranas. Además, la partición del oxígeno desde la fase

gaseosa a la red de membranas podría facilitarse en presencia de una película lipídica o lipoproteica interfacial.

La difusión de oxígeno a través de capas de membranas reconstituidas a partir de la fracción lipídica del surfactante resultó más rápida que la difusión a través de una capa similar de DPPC pura. El carácter más fluido y dinámico de las membranas que poseen la complejidad composicional del surfactante puede facilitar esa difusión. A este respecto, la optimizada coexistencia de fases existente en el surfactante pulmonar podría ser importante para mantener propiedades que podrían quizás estar al menos en parte relacionadas con una optimización de la difusión del oxígeno, tal y como han sugerido ciertos estudios sobre el efecto del estado de compresión de las películas lipídicas en la difusión de los gases (Ladanyi et al., 1992; Sáñez Macho et al., 2000).

Este estudio ha revelado también la importancia potencial de las proteínas hidrofóbicas del surfactante en la optimización de la difusión del oxígeno a través del surfactante. La capacidad de la SP-B y SP-C para la formación de contactos entre las membranas de forma que se facilite su interconexión y empaquetamiento (Perez-Gil, 2008), podría constituir la clave para la generación en la subfase de una estructura continua de membranas interconectadas, a través de la cual podría difundir el oxígeno. De esta forma, se evitaría la limitación del paso a través de fases acuosas, tal y como han sugerido también Aberg y colaboradores en su modelo teórico de difusión de oxígeno a través de membranas de surfactante (ver figura 4, de la Introducción) (Aberg et al., 2010).

Los experimentos de esta Tesis sugieren por lo tanto un posible papel del surfactante pulmonar como facilitador de la difusión del oxígeno desde los espacios alveolares a los capilares pulmonares, especialmente en lo que se refiere a la partición y difusión a través de la fina capa acuosa que recubre el epitelio. La disminución de la oxigenación sanguínea observada en pacientes de diversas patologías respiratorias como el ARDS, en las que existe una alteración de la estructura interfacial, ha sido siempre interpretada como una consecuencia de la reducción considerable de superficie de intercambio que supone el daño pulmonar y el colapso asociado a la disfunción del sistema surfactante (Gunther et al., 2001). Los resultados aquí presentados sugieren un componente adicional en la patofisiología del daño pulmonar agudo, de forma que la disminución de la oxigenación podría ser también consecuencia directa de la alteración de la capacidad del surfactante para facilitar el transporte de oxígeno a través del alveolo. Esta alteración podría deberse a una disrupción de la estructura de las proteínas hidrofóbicas del surfactante que produciría la discontinuidad de las membranas, a una disminución en la secreción de surfactante, o al incremento de la fase acuosa por la aparición de edema alveolar. Estos tres eventos constituyen de hecho características propias de las patologías pulmonares que cursan con una mala oxigenación sanguínea (Meyer y Zimmerman, 2002).

Cabe por tanto preguntarse si las adaptaciones fisiológicas a una limitada disponibilidad de oxígeno podrían incluir cambios en la composición y estructura del surfactante, particularmente con respecto al contenido, la organización y/o la disposición de las proteínas hidrofóbicas de los complejos interfaciales.

### **El modelo de exposición a hipoxia: 72 horas al 10% de oxígeno**

Los modelos animales de exposición a hipoxia han sido utilizados frecuentemente para estudiar el efecto de esta situación fisiopatológica en el organismo. En concreto, diferentes estudios en los que se sometió a los animales a una exposición al 10% de oxígeno durante distintos patrones temporales, han revelado alteraciones a nivel pulmonar tales como hiperventilación (Reeves, 2002) y alteración en la permeabilidad alveolar (Suzuki et al., 1999; Wodopia et al., 2000). La consecuencia inmediata de la eliminación insuficiente del fluido acumulado en los espacios alveolares es la aparición de edema pulmonar, aunque algunos autores sugieren que éste podría producirse tan sólo durante una primera fase (en torno a 16 horas), disminuyendo posteriormente si la exposición a la hipoxia continúa (Rassler et al., 2007). Del mismo modo, también podría tener una naturaleza temporal la inflamación pulmonar debida a la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y a la extravasación de proteínas plasmáticas, que remitiría una vez aclimatado el epitelio vascular (Gonzalez y Wood, 2010). A este respecto se ha sugerido incluso que el preconditionamiento de los animales a través de ciclos intermitentes con bajas concentraciones de oxígeno protegería a las células epiteliales alveolares frente a la hipoxia, gracias a la estimulación de la expresión de factores citoprotectores como las proteínas de choque térmico (Zhang et al., 2009b). Por otro lado, y en relación a cambios en la expresión de proteínas inducidos por la hipoxia en los modelos animales expuestos a un 10% de oxígeno, se han encontrado respuestas adaptativas con diversos patrones temporales de expresión, incluyendo distintos niveles de aumento de la expresión de genes implicados en la respuesta inmune y en la remodelación de la vasculatura pulmonar, en exposiciones a hipoxia de entre 1 y 7 días (Wu et al., 2008).

En el modelo utilizado en esta Tesis, la elección de una exposición de los animales al 10% de oxígeno durante 72 horas pretendía revelar potenciales mecanismos de adaptación del pulmón y del surfactante pulmonar a la hipoxia que requirieran cambios en el patrón de expresión de ciertas proteínas. También, y considerando las alteraciones de la ventilación pulmonar que produce la respuesta aguda a la hipoxia, se esperaba poder detectar cambios en la composición y el comportamiento del surfactante que pudieran estar relacionados con la optimización de la mecánica respiratoria en esas exigentes condiciones. No obstante, el estudio de los cambios ocurridos en este plazo relativamente largo de tiempo tras el desencadenamiento de la respuesta aguda puede suponer la pérdida de parte de la información relevante sobre los eventos asociados a la adaptación del surfactante a hipoxia durante las primeras horas de exposición. En los experimentos de PCR cuantitativa se ha podido detectar un claro incremento en la expresión de los factores inducibles por hipoxia HIF-1 $\alpha$  y HIF en los pulmones de

ratas sometidas a este modelo de hipoxia de 72 horas. Estos resultados son consistentes con los publicados previamente por otros autores en los que también se observó la inducción de HIF-1 $\alpha$  tras la exposición de animales a 10% de oxígeno (Palmer et al., 1998). No obstante existen otros experimentos en los que la respuesta de HIF-1 $\alpha$  resultó disminuir con el tiempo, sugiriendo un posible mecanismo de retroinhibición de esta proteína como consecuencia de la hipoxia crónica (Uchida et al., 2004; Grek et al., 2010). Estos estudios fueron, sin embargo, realizados *in vitro*, por lo que sus condiciones seguramente difieren en gran medida de la situación real *in vivo*, en la que las respuestas sistémicas podrían afectar al grado en el que la hipoxia afecta a nivel celular. En cuanto a HIMF, también se ha encontrado previamente una estimulación de su expresión en neumocitos tipo II y en las células de la vasculatura pulmonar como consecuencia de la exposición de los animales a un 10% de oxígeno, alcanzándose su nivel máximo en el día 1 de hipoxia, aunque sus niveles se mantienen durante 7 días (Teng et al., 2003).

### **Efecto de la hipoxia en el contenido total de lípidos y proteínas en el lavado broncoalveolar y el surfactante pulmonar**

La hiperventilación exhibida por las ratas sometidas a hipoxia podría estar asociada a un incremento de la cantidad de surfactante en los pulmones de estos animales, lo que podría ser importante para contrarrestar los efectos negativos que ésta pudiera tener sobre la función surfactante. Varios estudios han mostrado que el estiramiento de los neumocitos tipo II causado por la distensión pulmonar podría de hecho estimular la secreción de surfactante (Massaro y Massaro, 1983; Wirtz y Dobbs, 1990; Dietl et al., 2001). A este respecto hemos detectado en nuestros experimentos una tendencia al aumento, aunque no estadísticamente significativo, del contenido en fosfolípidos tanto en el surfactante pulmonar completo como en las fracciones de LA (agregados grandes) y SA (agregados pequeños) de las ratas sometidas a hipoxia. Por otro lado, la relación de fosfolípido en agregados pequeños y grandes del surfactante (SA/LA) permaneció inalterada en estos animales. Considerando que la alteración de esta relación por aumento de la fracción inactiva de surfactante (SA) y disminución del subtipo activo (LA) se correlaciona con el daño pulmonar (Lewis et al., 1990; Veldhuizen et al., 1995), los resultados del presente estudio sugieren que el modelo de hipoxia utilizado no produce un daño importante al menos en lo que se refiere al metabolismo del surfactante en los espacios alveolares. Este hecho, junto con la tendencia a acumular una mayor cantidad de surfactante que han mostrado estas ratas, parece sugerir una respuesta adaptativa del surfactante pulmonar a la situación de hipoxia mantenida durante 72 horas. Tampoco se detectó una alteración del contenido en colesterol del surfactante cuando se compararon ambos grupos de animales. El incremento de la fracción de lípidos neutros en el surfactante es otro parámetro que parece asociado al daño pulmonar agudo (Markart et al., 2007).

Los análisis composicionales indican un incremento en el contenido de proteína total en los lavados broncoalveolares de las ratas expuestas a hipoxia. La hipertensión

pulmonar asociada a hipoxia y la alteración de la permeabilidad vascular podría facilitar el daño de la barrera alveolo capilar durante los procedimientos de obtención del lavado broncoalveolar. Por este motivo se diseñó un protocolo experimental que incluía la perfusión de los animales para sustituir la sangre por solución salina antes de la instilación del tampón utilizado para extraer el LBA. En cualquier caso, el aumento del contenido total de proteínas en LBA ha sido correlacionado en numerosos estudios que han caracterizado alteraciones pulmonares como el ARDS, con un aumento de las proteínas séricas en los espacios alveolares como consecuencia de la alteración de la barrera alveolo-capilar y la extravasación de componentes plasmáticos, y esto se ha asociado con la inhibición de la función del surfactante en estos pulmones inflamados (Meyer y Zimmerman, 2002; Lewis y Veldhuizen, 2003). El aumento en el contenido de proteínas en los LBA de ratas hipóxicas podría aún deberse por tanto a una cierta extravasación de proteínas plasmáticas como consecuencia de la alteración de la permeabilidad de la barrera alveolo-capilar. Sin embargo, y a pesar de estos cambios observados en los LBAs, no se observó un aumento significativo de la cantidad de proteína total asociada al surfactante aislado de pulmones de ratas sometidas a hipoxia, y el ligero incremento en la relación proteína-lípido no produce tampoco alteración aparente de la capacidad del surfactante para formar películas interfaciales.

### **Efecto de la hipoxia en la expresión de las proteínas del surfactante**

Numerosos estudios previos han tratado de relacionar el surfactante pulmonar con distintos estados de disponibilidad de oxígeno. Estos estudios son de muy distinta naturaleza, ya que algunos se basan en modelos de hiperoxia (Nogee et al., 1991; Wikenheiser et al., 1992; White et al., 2001; Zenri et al., 2004; Dombrowsky et al., 2006), mientras otros se refieren a los ambientes hipóxicos a los que se encuentra sometido el feto (Gortner et al., 2005; Asikainen et al., 2006), o a la hipoxia hipobárica producida por la elevada altitud (Chander et al., 1975; Chander et al., 1977; Mairbaurl, 2006). Finalmente otros estudios describen experimentos realizados disminuyendo la presión de oxígeno en el aire (Takahashi et al., 1989; Vaporidi et al., 2005).

En cuanto a la relación entre el surfactante y los factores inducidos por hipoxia, existen estudios que muestran que el factor VEGF se expresa en neumocitos tipo II y está relacionado con la maduración del surfactante pulmonar (Compernelle et al., 2002), y que HIMF podría estar relacionado con cambios en la expresión del mRNA de las proteínas del surfactante (Tong et al., 2006a). Todos estos estudios utilizan diferentes tiempos de exposición y grado de severidad de hipoxia, así como sistemas modelo de muy distinta naturaleza, tanto *in vivo* como *in vitro*, lo que dificulta la extracción de conclusiones generales en cuanto a la relación existente entre la hipoxia y la producción de surfactante pulmonar. La mayoría de estas relaciones han tratado de establecerse desde el punto de vista del control y regulación de la maduración pulmonar. En este sentido es importante mencionar que el ambiente hipóxico en el que se encuentra el feto es imprescindible para un correcto desarrollo pulmonar inducido por incrementos en las proteínas HIF-1 $\alpha$  y VEGF (Asikainen et al., 2006). En concreto, los ratones

transgénicos que carecen de HIF-1 $\alpha$  expresan una menor cantidad de SP-A, SP-B y SP-C (Saini et al., 2008), y la suplementación con VEGF en fetos que carecen de esta proteína tiene como consecuencia el aumento en la expresión de mRNA de SP-B y SP-C y el aumento del contenido de fosfolípidos en el surfactante (ligado a una mayor conversión de glucógeno) (Compernelle et al., 2002). Este aumento en la expresión del mRNA de las proteínas del surfactante también ha sido observado tras la instilación de HIMF en ratones (Tong et al., 2006a). Por otro lado, estudios desarrollados con cultivos celulares mostraron que la adición de VEGF a cultivos de neumocitos tipo II de rata también desencadenaba un aumento en la expresión del mRNA de la SP-B (Raoul et al., 2004).

A diferencia de todos estos estudios que sugieren un efecto de la hipoxia en la inducción de la expresión de las proteínas del surfactante, los experimentos descritos en este capítulo no muestran este tipo de efectos como consecuencia de la exposición a hipoxia en las condiciones seleccionadas. Los niveles de expresión de los mRNAs de SP-A, SP-B, SP-C, SP-D y ABCA3 permanecieron estables tras las 72 horas de exposición al 10% de hipoxia. Consistentemente, tampoco se detectaron cambios en los niveles de las proteínas SP-A, SP-B y SP-C en los lavados broncoalveolares de las ratas hipóxicas, según muestran los resultados obtenidos mediante Western blot. En el estudio proteómico del tejido pulmonar se detectó la presencia de SP-A, sin que los niveles de ésta mostraran diferencias al comparar animales normóxicos e hipóxicos. Podría resultar que el efecto de la hipoxia en la expresión de los componentes del sistema surfactante se limitara tan sólo a la vida fetal o perinatal del animal o a que estos efectos se produzcan solo durante periodos de tiempo inmediatamente posteriores a la exposición a hipoxia, normalizándose posteriormente los niveles de las proteínas. Por ejemplo, Grek y colaboradores encontraron que la exposición de neumocitos tipo II a una concentración limitante de 1% de oxígeno durante 20 horas, produjo una disminución en los niveles de proteínas proSP-B y proSP-C analizados mediante Western blot, mientras que sus mRNA permanecieron inalterados en el caso de la SP-B o sólo ligeramente disminuidos para la SP-C (Grek et al., 2010). Las diferencias metodológicas existentes entre el mencionado estudio y el mostrado en esta Tesis, como la utilización de un modelo *in vitro*, la mayor severidad del tratamiento de hipoxia y el menor tiempo de exposición, podrían explicar los diferentes resultados observados. En cualquier caso, y más allá del efecto de la hipoxia en la inducción de la síntesis de surfactante, no hemos encontrado en el presente estudio el incremento en la producción de las proteínas SP-B y SP-C que podría suponer un posible mecanismo adaptativo que mejorara el transporte de oxígeno a través de las películas interfaciales de surfactante, en el hipotético caso de que las proteínas hidrofóbicas formaran parte de estructuras especializadas con esa función.

Por último cabe resaltar la presencia en los Western blots que analizaban el comportamiento proteico del lavado broncoalveolar y del surfactante, de una banda de elevada masa molecular, que apareció de manera inespecífica en las muestras de todos los animales estudiados independientemente del anticuerpo empleado. La incubación de

las membranas con las proteínas transferidas en presencia de un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo, sin previa incubación con anticuerpo primario, reveló la aparición de una banda de aproximadamente 75 kDa que podría corresponder a una cadena pesada (50 kDa) y una ligera (25 kDa) de inmunoglobulina. La identidad de esta proteína se confirmó mediante análisis de huella peptídica. Los niveles de esta IgG fueron significativamente más altos en los lavados broncoalveolares de las ratas que fueron sometidas a hipoxia. Las inmunoglobulinas son proteínas importantes en los mecanismos de defensa inmune del pulmón. La interacción de la IgG con la SP-A ha sido previamente demostrada por estudios que sugieren un posible papel de la primera en la prevención de la inflamación en el pulmón (Lin y Wright, 2006). El aumento de inmunoglobulina en el lavado broncoalveolar como consecuencia de la exposición a la hipoxia podría estar relacionado con una cierta extravasación desde el plasma por las alteraciones de la vasculatura pulmonar, pero también podría constituir una respuesta específica inducida por la hipoxia con fines anti-inflamatorios para la protección del pulmón.

### **Efecto de la hipoxia en la función del surfactante pulmonar**

Para estudiar si el incremento de la cantidad de proteínas en los espacios alveolares inducido por hipoxia altera la capacidad del surfactante para formar películas tensioactivas, se llevó a cabo un experimento para evaluar la capacidad de adsorción del surfactante de las ratas sometidas a hipoxia a la interfase aire-líquido.

Como se ha explicado en la Introducción, los estados inflamatorios del pulmón se han relacionado con una disminución en la función tensioactiva del surfactante pulmonar (Meyer y Zimmerman, 2002). La inflamación puede afectar al surfactante de dos maneras: mediante la alteración de los neumocitos tipo II por mediadores inflamatorios que pueden reducir la síntesis, secreción y/o reciclaje de sus componentes, o por la inhibición de la acción tensioactiva del surfactante por proteínas plasmáticas. Los experimentos funcionales muestran sin embargo, que a pesar de que, como se discutirá más adelante, los resultados de proteómica revelan una respuesta inflamatoria en los pulmones de las ratas sometidas a hipoxia, la capacidad del surfactante de estos animales para adsorberse y extenderse a lo largo de la superficie interfacial permanece inalterada. De hecho, son necesarias incluso menores cantidades de surfactante de las ratas hipóxicas para alcanzar las presiones superficiales máximas, lo que significa mejores propiedades de este material. Esta correcta funcionalidad del surfactante de las ratas hipóxicas es también consistente con los resultados obtenidos tras la determinación de la relación de fosfolípidos en las fracciones SA y LA de surfactante, que mostraron la presencia de niveles normales de la fracción activa de este surfactante.

Las implicaciones de estos resultados deben confirmarse, aunque podrían sugerir una respuesta compensatoria del surfactante pulmonar para lograr mantener un comportamiento tensioactivo normal a pesar de los efectos inhibitorios causados por la

inflamación, lo cual sería también consistente con la tendencia a un mayor contenido en fosfolípidos observado en el surfactante de las ratas hipóxicas.

### **Efecto de la hipoxia en el perfil proteómico del lavado broncoalveolar y del tejido pulmonar**

La principal ventaja de la técnica 2D-DIGE aplicada al análisis del complemento proteómico de muestras biológicas mediante electroforesis bidimensional reside en su elevada reproducibilidad y sensibilidad debido a la utilización de estándares internos que minimizan la variabilidad existente entre los distintos geles (Karp y Lilley, 2007; Cairns, 2011). Existen numerosos estudios que han examinado el perfil proteómico del lavado broncoalveolar de animales con diversas patologías pulmonares, mostrando que esta técnica supone una herramienta muy útil para comparar cuantitativamente las diferencias del patrón de proteínas presentes entre diferentes estados fisiopatológicos (Wattiez y Falmagne, 2005; Magi et al., 2006; Umstead et al., 2009).

La primera conclusión que se puede extraer de los resultados obtenidos en el estudio de 2D-DIGE de estas muestras es la existencia de cambios significativos en un número mucho mayor de proteínas de los lavados broncoalveolares de ratas hipóxicas (25 proteínas) que en el propio tejido pulmonar de los mismos animales (7 proteínas). Con respecto al posible origen de las proteínas detectadas en las muestras de LBA, éstas podrían proceder de diferentes fuentes. Las proteínas séricas podrían filtrarse a los espacios aéreos debido a los cambios en la vasculatura pulmonar, mientras que otras proteínas podrían ser sintetizadas en el tejido, principalmente en los neumocitos tipo II y en los macrófagos alveolares, y llegar al LBA por secreción o por ruptura celular. Los datos obtenidos parecen sugerir que la mayoría de las proteínas cuyos niveles resultan afectados por la exposición a hipoxia podrían ser proteínas liberadas de alguna manera a las vías aéreas. De esta manera los cambios fisiopatológicos debidos a dicho estímulo serían principalmente consecuencia de cambios en la secreción o liberación, permaneciendo normales los niveles en el tejido pulmonar. Parte de las proteínas cuyos niveles se alteran en los lavados broncoalveolares podrían tener además un origen sérico, por lo que sus niveles en el pulmón hipóxico permanecerían relativamente normales (se encuentren dentro o fuera de la red vascular), mientras que los cambios serían detectados fundamentalmente en los LBAs ya que sólo en estas muestras sería apreciable la extravasación de las proteínas plasmáticas a las vías aéreas por la alteración de la permeabilidad vascular.

Para poder analizar desde una perspectiva general los efectos principales de la exposición a hipoxia en la composición del lavado broncoalveolar y del tejido pulmonar, las proteínas que mostraron cambios significativos fueron clasificadas en 4 grupos funcionales (tabla 9). En el **anexo II** se puede encontrar un resumen de las principales características de las proteínas detectadas y de las referencias utilizadas para asignar cada una de ellas a esos grupos funcionales. El primer grupo (IMM) está constituido por proteínas relacionadas con la respuesta inmune del pulmón, incluyendo



las proteínas implicadas en el amplio rango de procesos relacionados con la defensa y la inflamación tisular. El segundo grupo (MET) incluye proteínas implicadas en el metabolismo molecular, principalmente de lípidos. El tercer grupo (CYT) está formado por proteínas relacionadas con el citoesqueleto, principalmente implicadas en la reorganización del citoesqueleto de las células endoteliales de la vasculatura pulmonar. Por último, el cuarto grupo (RED) consiste en proteínas implicadas en la regulación del balance redox, incluyendo las implicadas en procesos de detoxificación así como las relacionadas con la respuesta al estrés oxidativo en general.

#### Lavado broncoalveolar

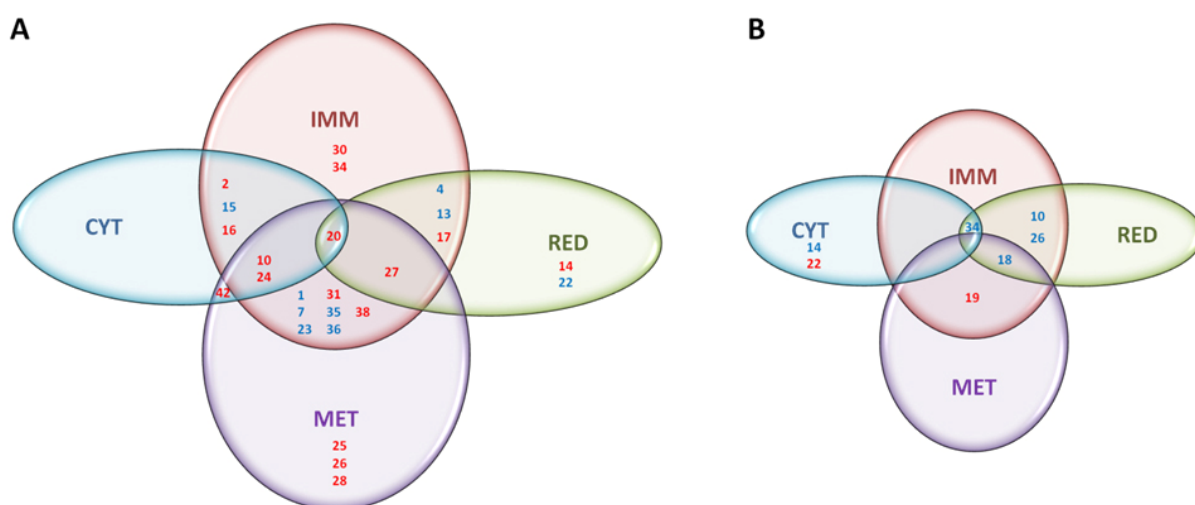
| <u>Número<br/>(ver fig. 96)</u> | <u>Nombre de la proteína</u>                                                             | <u>Grupo funcional</u> |
|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| 1                               | Aa2-001                                                                                  | IMM, MET               |
| 2                               | Abhydrolase domain containing 14b                                                        | IMM, CYT               |
| 4                               | Albumin                                                                                  | IMM, RED               |
| 7                               | Alpha-1-inhibitor III precursor (Murinoglobulin 1)                                       | IMM, MET               |
| 10                              | Annexin A5 (Lipocortin V)                                                                | IMM, MET, CYT          |
| 13                              | Ceruloplasmin                                                                            | IMM, RED               |
| 14                              | Cu/Zn superoxide dismutase                                                               | RED                    |
| 15                              | Fetuin beta                                                                              | IMM, CYT               |
| 16                              | Gelsolin                                                                                 | IMM, CYT               |
| 17                              | Glutathione S-transferase Y-b subunit (EC 2.5.1.18)                                      | IMM, RED               |
| 20                              | Haptoglobin                                                                              | IMM, MET, CYT, RED     |
| 22                              | Hemopexin                                                                                | RED                    |
| 23                              | Inter-alpha-inhibitor H4 heavy chain                                                     | IMM, MET               |
| 24                              | Lipocortin I                                                                             | IMM, MET, CYT          |
| 25                              | Protein expressed in non-metastatic cells 2 (NM23B)                                      | MET                    |
| 26                              | Pcyt2 protein                                                                            | MET                    |
| 27                              | Peroxiredoxin 6                                                                          | IMM, MET, RED          |
| 28                              | Phosphatidylethanolamine binding protein                                                 | MET                    |
| 30                              | Protein Plunc (Palate lung & nasal epithelium clone protein)                             | IMM                    |
| 31                              | Protein RAKc                                                                             | IMM, MET               |
| 34                              | Selenium binding protein 1                                                               | IMM                    |
| 35                              | Serine protease inhibitor 1                                                              | IMM, MET               |
| 36                              | Serine protease inhibitor 2b                                                             | IMM, MET               |
| 38                              | Similar to SPI6                                                                          | IMM, MET               |
| 42                              | Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta polypeptide | MET, CYT               |

#### Homogeneizado de pulmón

| <u>Número<br/>(ver fig. 97)</u> | <u>Nombre de la proteína</u>            | <u>Grupo funcional</u> |
|---------------------------------|-----------------------------------------|------------------------|
| 10                              | Calreticulin                            | IMM, RED               |
| 14                              | Desmin                                  | CYT                    |
| 18                              | Grp75 (Mortalin) (Heat shock protein 9) | IMM, MET, RED          |
| 19                              | Guanine deaminase                       | IMM, MET               |
| 22                              | Lamin-A                                 | CYT                    |
| 26                              | Peroxiredoxin 4                         | IMM, RED               |
| 34                              | Transferrin                             | IMM, CYT, RED          |

**Tabla 9.** Lista de proteínas que presentan cambios significativos en las muestras de lavado broncoalveolar y tejido de los animales sometidos a hipoxia, y grupos funcionales a los que se asigna cada una de ellas. Los números rojos indican reducciones significativas de su nivel en hipoxia y los azules, incrementos. Los grupos funcionales son: IMM (proteínas implicadas en respuesta inmune), MET (proteínas relacionadas con el metabolismo), CYT (proteínas del citoesqueleto) y RED (proteínas implicadas en el balance redox).

Como se puede observar en el solapamiento de los grupos funcionales en el diagrama de Venn representado en la figura 100, la mayoría de las proteínas pueden incluirse en varios de los grupos, debido a la existencia de múltiples funciones asignadas a cada una de ellas. En los lavados broncoalveolares, 19 de las proteínas con cambios significativos pueden incluirse en el grupo IMM, 15 proteínas en MET, 7 proteínas en CYT y 7 proteínas en RED. En las muestras de homogeneizado de pulmón, 5 proteínas pertenecen al grupo IMM, 2 proteínas a MET, 3 proteínas a CYT y 4 proteínas a RED.



**Figura 100.** Diagramas que ilustran el grado de solapamiento de los grupos funcionales a los que pertenecen las proteínas que muestran cambios significativos en lavado broncoalveolar (**A**) y homogeneizado de pulmón (**B**) como consecuencia de la hipoxia. Los números corresponden a las proteínas de la tabla 9 (disminuciones en rojo e incrementos en azul), y el tamaño de los números refleja la magnitud del cambio de nivel de cada proteína en cuestión, según aparece en las tablas 6 y 8.

En primer lugar cabe mencionar la localización de la haptoglobina en el centro del diagrama para las muestras de lavado broncoalveolar, encontrándose además muy reducida en los animales expuestos a hipoxia (más de 1,5 veces con respecto a las ratas control). Esta proteína plasmática posee un papel antiinflamatorio, detoxificante y estimulador de la angiogénesis (de Kleijn et al., 2002; Ngai et al., 2007), y a diferencia de lo observado en el presente estudio, su presencia en lavado broncoalveolar se ha encontrado incrementada en situaciones de daño pulmonar (Bowler et al., 2009; Zhang et al., 2009a).

La distinta contribución a la respuesta a hipoxia de las diversas proteínas dentro de cada grupo, complica la elaboración de conclusiones generales a partir de todos los datos disponibles. Además, si se comparan los niveles de ciertas proteínas en los dos tipos de muestras estudiadas, puede observarse que algunas de ellas presentan cambios significativos en LBA pero no en el tejido pulmonar: albúmina, gelsolina, lipocortina I, peroxiredoxina 6, proteína RAKc y proteína de unión a selenio SBP1. Del mismo modo se observa también que varias de las proteínas alteradas en el tejido pulmonar de las ratas hipóxicas, guanina deaminasa y transferrina, no muestran cambios detectables en el LBA de estos animales.

Entre las proteínas cuyos niveles de expresión resultan afectados por la exposición a la hipoxia, aparecen dos para las que se ha descrito algún tipo de **relación directa con el surfactante pulmonar**. En primer lugar, la **calreticulina**, cuyos niveles resultan incrementados en el pulmón de las ratas hipóxicas, es una proteína implicada en la regulación de calcio que es además expresada por los neumocitos tipo II y participa supuestamente en la modulación de la inflamación pulmonar mediante interacción con SP-A y SP-D (Kuroki et al., 2007). Su aumento en respuesta a la hipoxia podría estar conectado con la existencia de eventos inflamatorios en el pulmón de estos animales. En segundo lugar, la **peroxirredoxina 6** es una peroxidasa que protege a las células de las especies reactivas de oxígeno, y que posee además actividad fosfolipasa A<sub>2</sub>. Esta proteína es sintetizada por las células Clara, neumocitos tipo II y macrófagos alveolares. En los neumocitos es responsable de la degradación de la DPPC durante el metabolismo del surfactante pulmonar, y su actividad es inhibida por la presencia de SP-A (Chen et al., 2000; Fisher y Dodia, 2001; Wu et al., 2006; Schremmer et al., 2007; Fisher, 2011). Su disminución en las muestras de lavado broncoalveolar de las ratas hipóxicas podría estar asociada a la alteración en el balance REDOX en el pulmón, o a una menor tasa de metabolización del surfactante en los neumocitos. Existe además otra proteína que podría estar relacionada con el sistema surfactante pulmonar, aunque de una manera más indirecta. La lipocortina o **anexina I** es una proteína de unión a lípidos y a proteínas del citoesqueleto sintetizada por los neumocitos tipo II y los macrófagos alveolares. Su expresión es inducida por glucocorticoides y gracias a su actividad inhibidora de la fosfolipasa A<sub>2</sub> posee un papel antiinflamatorio (Mayran et al., 1996; Gerke y Moss, 2002). La disminución de sus niveles en los lavados broncoalveolares de ratas sometidas a hipoxia podría reflejar por tanto una alteración de la integridad celular de los neumocitos o una respuesta proinflamatoria en el pulmón.

Por otro lado, algunas de las proteínas que han resultado alteradas en los animales expuestos a hipoxia en el presente estudio, han sido ya previamente descritas como **proteínas de respuesta a hipoxia**. La **ceruloplasmina** es una proteína plasmática cuya expresión aumenta en respuesta a la hipoxia debido a la necesidad de un mayor transporte de hierro como consecuencia del aumento de la hematopoyesis (Baker et al., 2000; Martin et al., 2005; Healy y Tipton, 2007; White et al., 2009b). En los resultados de este trabajo, la ceruloplasmina es la proteína con mayor cambio observado en sus niveles en las muestras de ratas sometidas a hipoxia (134,7%). Su incremento en los

lavados broncoalveolares podría deberse a la extravasación plasmática producida como consecuencia de la alteración de la vasculatura pulmonar causada por la hipoxia. La **superóxido dismutasa Cu/Zn**, con función detoxificadora, presenta niveles reducidos en respuesta a hipoxia en los macrófagos hepáticos (White et al., 2009b), al igual que ocurre en los LBAs de las ratas hipóxicas analizadas aquí. La **calreticulina**, con mayores niveles en el pulmón de las ratas hipóxicas, también había resultado incrementada en estudios previos en neumocitos tipo II, lo que podría estar relacionado con su papel antioxidante (Jia et al., 2008). Por último, la **grp75** es una proteína de respuesta a estrés cuyos niveles se han encontrado también incrementados en un modelo *in vitro* que simula condiciones de hipoxia (Flores-Díaz et al., 2004).

En cuanto a la relación de las proteínas alteradas con los **procesos inflamatorios** (grupo IMM) asociados a diferentes situaciones fisiopatológicas descritas en la literatura (ver anexo II), cabe resaltar que la respuesta a hipoxia caracterizada en el presente estudio incluye el incremento de los niveles de varias **proteínas anti-inflamatorias**: precursor del inhibidor alfa-1-antitripsina III, inhibidores de las serin proteasas 1 y 2b e inter-alfa-inhibidor, calreticulina y grp75. Además aparecen también elevados niveles de ciertas **proteínas de origen plasmático** cuya localización en los LBAs se debe principalmente a la extravasación a los espacios aéreos, indicando por lo tanto inflamación pulmonar y alteración de la barrera alveolo-capilar en las ratas sometidas a hipoxia: Aa2-001, albúmina, ceruloplasmina - aumentada también en pacientes con ARDS (Baker et al., 2000) -, fetuína beta, y transferrina. No obstante, los niveles de ciertas proteínas anti-inflamatorias como la haptoglobina, la anexina I y el inhibidor de serinproteasas SPI6, resultan reducirse.

El estudio de la alteración de proteínas implicadas en el metabolismo (grupo MET), revela posiblemente una **reducción general de los procesos metabólicos**, lo que constituye un componente ampliamente descrito de la respuesta a la hipoxia con el propósito del ahorro energético en una situación en la que el ATP no puede ser obtenido por vías oxidativas. Estas proteínas con niveles disminuidos en las muestras de las ratas sometidas a hipoxia incluyen principalmente aquellas implicadas en el metabolismo lipídico, como las anexinas 1 y 5, Pcyt 2, PEBP y peroxiredoxina 6, y también aquellas implicadas en el metabolismo de otras moléculas, como la proteína activadora de las monooxigenasas (implicada en la síntesis de serotonina y catecolaminas), o la NM23B, implicada en el metabolismo de nucleósidos.

Respecto a las proteínas relacionadas con el citoesqueleto celular, principalmente de las células endoteliales (grupo CYT), sus cambios en las muestras de animales hipóxicos indican la existencia de una remodelación vascular que podría estar en parte relacionada con la alteración de la permeabilidad de la barrera alveolo-capilar, pero también con el inicio de los procesos de angiogénesis que también acaban desencadenando la exposición prolongada a hipoxia. La presencia de estas proteínas en el LBA podría ser por tanto debida a la liberación por daño celular, o a la secreción directa a los espacios alveolares, como es el caso de ciertas anexinas que parecen ser

secretadas conjuntamente con los lípidos del surfactante a través de los cuerpos lamelares (Sohma et al., 1995). La mayoría de las **proteínas relacionadas con el citoesqueleto** aparecen en **niveles reducidos** en las muestras de ratas sometidas a hipoxia: proteína con dominio abhidrolasa, anexinas 1 y 5, gelsolina, haptoglobina, proteína activadora de las monooxigenasas, o lámina A.

Finalmente existen numerosas proteínas cuyos niveles se alteran en este estudio y que están relacionadas con el balance oxidación-reducción y con la detoxificación en el pulmón (grupo RED). Se ha encontrado un aumento de **proteínas antioxidantes**, como la calreticulina o la peroxirredoxina 4, mientras otras muestran niveles reducidos en las muestras de ratas sometidas a hipoxia, como la superóxido dismutasa, la glutatión S-transferasa o la peroxirredoxina 6. Dentro de este grupo se encuentran también proteínas cuyo **incremento** podría estar relacionado con un **papel detoxificante** debido a su capacidad de **unión al hierro**, una función que cobraría especial importancia por el aumento de la hematopoyesis inducido por la exposición a la hipoxia (White et al., 2009a): albúmina, ceruloplasmina, hemopexina y transferrina.

En resumen, los resultados obtenidos mediante el estudio proteómico de las muestras indican que la exposición de los animales a hipoxia durante 72 horas ha desencadenado una respuesta en el pulmón caracterizada principalmente por inflamación, extravasación de proteínas plasmáticas a los espacios aéreos posiblemente asociada a la alteración del citoesqueleto de las células vasculares, estrés oxidativo reflejado por la alteración de los niveles de los factores antioxidantes, y disminución de los procesos metabólicos.

### **Efecto de la hipoxia en los niveles de hemoglobina en pulmón**

En los experimentos de PCR cuantitativa se observó un claro incremento en la expresión de mRNA de las globinas  $\alpha$  y  $\beta$  en el pulmón de las ratas expuestas a hipoxia. La expresión de hemoglobina en tejidos no eritropoyéticos ha sido demostrada en diversos estudios durante los últimos años (Liu et al., 1999; Mansergh et al., 2008; Nishi et al., 2008; Richter et al., 2009), y en particular, su expresión ha sido también detectada en los neumocitos tipo II en condiciones normales, tanto en experimentos *in vitro* (Bhaskaran et al., 2005; Newton et al., 2006) como *in vivo* (Grek et al., 2010). Recientemente además, Grek y colaboradores observaron también una inducción de la expresión de hemoglobina en cultivos celulares como respuesta a la exposición de los neumocitos a hipoxia (Grek et al., 2010).

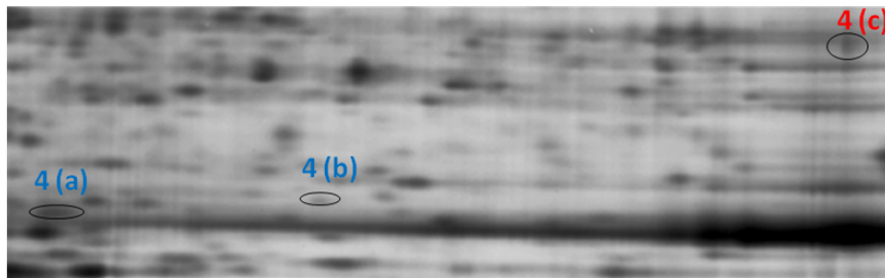
El presente estudio confirma estos datos y los extiende a la respuesta fisiológica a la hipoxia *in vivo*. El aumento en la expresión de mRNA de la hemoglobina resulta además correlacionarse con el aumento de los niveles de la proteína tanto en el lavado broncoalveolar como en el surfactante pulmonar, tal y como mostraron los datos de Western blot. Parece lógico pensar que al menos una parte de esta hemoglobina del LBA podría proceder de contaminación sanguínea. Para reducir esta posibilidad al máximo, los LBA de los animales del presente estudio se obtuvieron tras perfusión

sanguínea, para eliminar los componentes plasmáticos antes de iniciar la manipulación necesaria de los órganos para obtener los lavados. Cabe entonces pensar que una fracción considerable de hemoglobina encontrada en el surfactante podría ser debida a secreción por parte de los neumocitos que expresan esta proteína. Esta hipótesis se ve respaldada por el hecho de que se encontró también hemoglobina en las muestras de surfactante pulmonar de los animales control, en los que presumiblemente no han existido cambios en la permeabilidad vascular y por tanto la proteína recuperada en el surfactante no debería provenir mayoritariamente de extravasación desde el plasma. Considerando que durante la purificación del surfactante se realiza una centrifugación en gradiente de densidad para eliminar posibles contaminantes sanguíneos, la presencia de hemoglobina asociada al surfactante parece indicar, en primer lugar, que ésta no es una mera contaminación, y en segundo lugar que existe una interacción relativamente estable entre la hemoglobina y los complejos de surfactante, posiblemente en el marco de las interacciones ya anteriormente descritas de esta proteína con otros tipos de bicapas lipídicas (Szebeni et al., 1988).

En los análisis proteómicos, se detectó la presencia de **globina  $\beta$**  tanto en los LBAs como en el tejido pulmonar de ratas controles e hipóxicas, sin encontrarse diferencias significativas en los niveles de expresión de esta proteína entre ambos grupos de animales. No obstante se observó una tendencia a mayores niveles, aunque no significativos, de esta subunidad en los LBAs de las ratas sometidas a hipoxia (ver figura **104** del **anexo I**), que sería consistente con los resultados obtenidos por Western blot. Respecto a la **globina  $\alpha$** , los niveles de esta subunidad no mostraron diferencias significativas cuando se compararon en el tejido pulmonar de los dos grupos de animales, aunque un análisis más detallado cuantificando por separado los 3 puntos identificados como alfa globina reveló cambios significativos en el perfil de isoformas de globina  $\alpha$  en las ratas sometidas a hipoxia (figura **101**). El punto correspondiente a la forma con mayor masa molecular (27 kDa) y punto isoeléctrico de 8.4, podría corresponder a un dímero de  $\alpha$ -globinas, ya que la masa molecular de la cadena alfa es aproximadamente de 15 kDa. Recientemente, Ishikawa y colaboradores han encontrado complejos de alfa globina en tejido pulmonar humano mediante electroforesis bidimensional (Ishikawa et al., 2010). Su estudio reveló que estos complejos diméricos pasaban a forma monomérica en pulmones de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática, lo que ha llevado a sugerir que la inhibición en la formación del complejo podría deberse a modificaciones de la proteína causadas por el estrés oxidativo o nitrosidativo. Los menores niveles del complejo de  $\alpha$ -globina encontrado en el presente estudio en los pulmones de ratas sometidas a hipoxia podrían estar por tanto relacionados con el estrés oxidativo producido por la hipoxia y revelado por los experimentos de proteómica. Los otros dos puntos identificados como  $\alpha$ -globina en las muestras de tejido corresponden a formas de masa molecular de aproximadamente 17 kDa y puntos isoeléctricos de en torno a 5 y 6. Resulta de momento difícil discernir si estos cambios tan radicales de pI muestran la existencia de distintas isoformas monoméricas de  $\alpha$ -globina con un posible papel en la adaptación pulmonar a hipoxia, o

si se trata de meros artefactos de la electroforesis o de la identificación. Por último, cabe destacar que no se ha conseguido detectar la presencia de  $\alpha$ -globina en los LBAs, lo cual podría significar que aunque ambas cadenas se sintetizan en el pulmón tan sólo la globina  $\beta$  se secreta a las vías aéreas. La utilización de un anticuerpo no específico de subunidad en los experimentos de Western blot no permite revelar si la hemoglobina encontrada en el LBA y en el surfactante pulmonar está constituida por uno o los dos tipos de globina. Por último, cabe mencionar que aunque la hemoglobina predominante en vertebrados está formada por dos subunidades  $\alpha$  y dos  $\beta$ , muchas especies son capaces de sintetizar distintas isoformas de hemoglobina de manera que los ajustes en la estequiometría del complejo podría proporcionar ciertas adaptaciones importantes para el transporte de oxígeno en ciertas condiciones de hipoxia (Storz y Moriyama, 2008). Podría ocurrir que en tejidos no hematopoyéticos, la estequiometría de los complejos de hemoglobina fuera diferente (Mansergh et al., 2008), y que ello respondiera de alguna manera particular a adaptaciones funcionales singulares, como podría ser un posible papel sensor o transportador del oxígeno en el pulmón.

**A**



**B**

| Punto | Media (control)   | Media (hipoxia)    | p-valor ( <i>t-test</i> ) |
|-------|-------------------|--------------------|---------------------------|
| 4 (a) | $0.919 \pm 0.039$ | $1.037 \pm 0.025$  | 0.030                     |
| 4 (b) | $0.932 \pm 0.026$ | $1.048 \pm 0.0325$ | 0.020                     |
| 4 (c) | $1.094 \pm 0.046$ | $0.910 \pm 0.065$  | 0.045                     |

**Figura 101.** Detalle de un gel bidimensional con las muestras de homogeneizado de pulmón (A) mostrando las isoformas de alfa globina (4a, b, c) y la alteración significativa de sus niveles en las muestras de normoxia e hipoxia cuando el análisis estadístico se realiza separadamente para cada punto en lugar de para la suma de todos los puntos de la proteína (B).





**NUEVAS APROXIMACIONES EN EL ESTUDIO DEL  
SURFACTANTE PULMONAR Y PERSPECTIVAS  
FUTURAS**



## **7. NUEVAS APROXIMACIONES EN EL ESTUDIO DEL SURFACTANTE PULMONAR Y PERSPECTIVAS FUTURAS**

En la presente Tesis se ha pretendido abordar el estudio de algunos aspectos novedosos relacionados con las relaciones estructura-función del sistema surfactante pulmonar, incluyendo la caracterización de sus complejos proteicos obtenidos presumiblemente de una forma más próxima a la nativa que en la tradicional purificación con disolventes orgánicos, y el estudio del posible papel del surfactante pulmonar en la difusión del oxígeno a través del alveolo como función adicional a la estabilización física de la interfase.

Los resultados aquí presentados apoyan la existencia de una organización supramolecular compleja de la proteína SP-B, cuya oligomerización resultaría alterada por la ruptura de las interacciones proteína-proteína nativas debido a la utilización de los disolventes orgánicos. La formación de un complejo proteico de SP-B, optimizado para favorecer el transporte de lípidos entre las membranas del surfactante, supone un grado de complejidad estructural y de especialización funcional mucho mayor que el supuesto hasta ahora. El modelo de oligomerización propuesto en este trabajo, así como las evidencias experimentales presentadas en su apoyo, estarían de acuerdo además con datos existentes en la literatura que, en los últimos años, han generado controversia en cuanto a ciertas características estructurales y funcionales de la SP-B. La estructura que se propone para la SP-B abre además una nueva perspectiva sobre las posibles estrategias que permitirán diseñar y producir nuevos surfactantes clínicos optimizados, y la utilidad real de análogos peptídicos simplificados como SP-B miméticos.

La demostración final de la presencia de esta estructura en el surfactante podría ser confirmada por futuros experimentos de mutagénesis de la SP-B en modelos animales, cuyos efectos puedan ser predichos por el modelo de oligomerización de la proteína. Algunas de estas mutaciones clave que ayudarían a validar estas estructuras podrían consistir en aquéllas que conllevaran según el modelo una alteración en el transporte de los fosfolípidos, afectando a la cavidad hidrofóbica o a la movilidad de la parte superior del dímero funcional que permite la apertura y el cierre de la cavidad. Otra posibilidad sería la generación de interacciones covalentes entre los monómeros del dímero funcional, de forma que se estabilicen e identifiquen los posibles oligómeros de SP-B de una manera sencilla.

En cuanto al segundo objetivo de la presente Tesis, los resultados obtenidos muestran una posible implicación de la red de estructuras membranosas que forma el surfactante pulmonar como facilitador de la difusión de oxígeno a través de la interfase alveolar. La composición lipídica del surfactante, pero fundamentalmente la presencia de las proteínas hidrofóbicas, parecen constituir la base necesaria para el desarrollo de esta propiedad. La capacidad de dichas proteínas para generar contactos entre las membranas del surfactante podría ser importante en la difusión de oxígeno mediante el establecimiento de un continuo de membranas en la subfase acuosa que conecte la

superficie epitelial con la propia interfase y la fase aérea. La oligomerización de la SP-B en forma de complejos como los descritos en esta Tesis, podría también jugar un papel importante en la generación de dicha estructura de membranas interconectadas.

La posible implicación del surfactante pulmonar en el transporte de oxígeno en la interfase respiratoria podría estar relacionada además de alguna manera con la expresión de hemoglobina en el pulmón y su inducción como respuesta a la hipoxia, que hasta el momento sólo habían sido demostradas *in vitro*. La asociación de la hemoglobina con el surfactante es intrigante y podría apuntar a la existencia de algún sistema sensor integrado en las estructuras interfaciales. No obstante, dado que el modelo de hipoxia utilizado en la presente Tesis no induce cambios en el contenido lipídico ni en la composición proteica del surfactante, futuros experimentos deberán aclarar si, posiblemente en modelos de hipoxia aguda, el surfactante podría formar parte de la respuesta adaptativa a la disminución de oxígeno en el medio.

## **CONCLUSIONES**



## 8. CONCLUSIONES

1. En el surfactante pulmonar existen complejos proteicos de elevada masa molecular que pueden ser obtenidos mediante solubilización suave con detergentes que preservan las interacciones nativas proteína-proteína.
2. En condiciones nativas se han detectado posibles interacciones entre las proteínas hidrofóbicas del surfactante y la proteína SP-A, tal y como sugieren los resultados de la cromatografía de intercambio iónico.
3. La separación de los complejos proteicos del surfactante en la cromatografía de intercambio iónico permitió la obtención de complejos constituidos principalmente por SP-B, cuya estructura secundaria y terciaria resultó similar a la de la SP-B purificada en disolvente orgánico.
4. Dichos complejos proteicos incluyen oligómeros de SP-B, detectados mediante electroforesis nativa, centrifugación analítica y microscopía electrónica. Su análisis mediante microscopía electrónica revela un tamaño de aproximadamente 10 nm, con una estructura definida en forma de anillo con un poro central.
5. La actividad interfacial de los complejos de SP-B purificados en detergente es similar a la mostrada por la SP-B purificada en disolvente orgánico, una vez reconstituidas en sistemas fosfolipídicos.
6. La reconstitución de la proteína mediante su incorporación a vesículas unilamelares preformadas, produce una adsorción interfacial reducida con respecto a la proteína reconstituida en suspensiones multilamelares, lo que ilustra la importancia de las estructuras multilamelares nativas del surfactante en la funcionalidad de las proteínas hidrofóbicas. La presencia de la fracción lipídica nativa del surfactante o de la proteína SP-C, supone una mejora en la capacidad de adsorción y en la estabilidad de las muestras con proteína incorporada a vesículas unilamelares.
7. Los complejos de surfactante pulmonar facilitan la difusión de oxígeno a través de la interfase aire-líquido. La composición lipídica del surfactante, pero sobre todo la presencia de las proteínas hidrofóbicas, resultan importantes para esta propiedad.
8. La exposición de ratas a una atmósfera con 10% de oxígeno durante 72 horas produce un aumento en los niveles de expresión de mRNA de los factores inducibles por hipoxia HIF-1 $\alpha$  y HIF en el pulmón.
9. La exposición de las ratas a dicho modelo de hipoxia produce un estado en el pulmón caracterizado por estrés oxidativo, alteración de la vasculatura pulmonar e inflamación, según revelaron el análisis proteómico y el aumento en los niveles de proteína en los lavados broncoalveolares.

10. No se observaron cambios en la expresión de las proteínas SP-A, SP-B, SP-C, SP-D y ABCA3, ni en el metabolismo lipídico del surfactante, manteniéndose normales la relación de fosfolípido en SA/LA, como consecuencia de la exposición de los animales a hipoxia. Además, el surfactante pulmonar de las ratas sometidas a hipoxia mostró una actividad interfacial normal, a pesar del estado inflamatorio del pulmón de estos animales.
11. Los experimentos de esta Tesis revelan, por primera vez *in vivo*, la expresión en el pulmón de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de la hemoglobina y su inducción como respuesta a la hipoxia. La presencia de hemoglobina en el surfactante podría sugerir una asociación de esta proteína con el sistema del surfactante pulmonar.

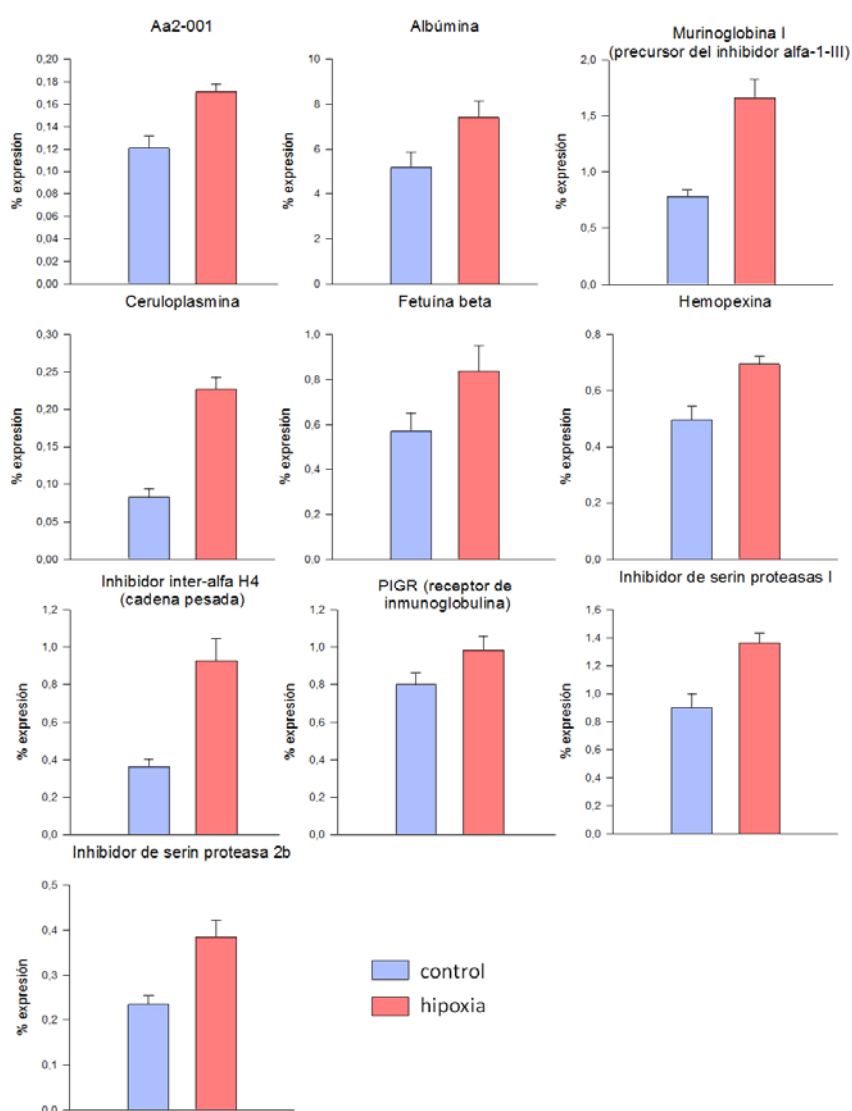


**ANEXOS**

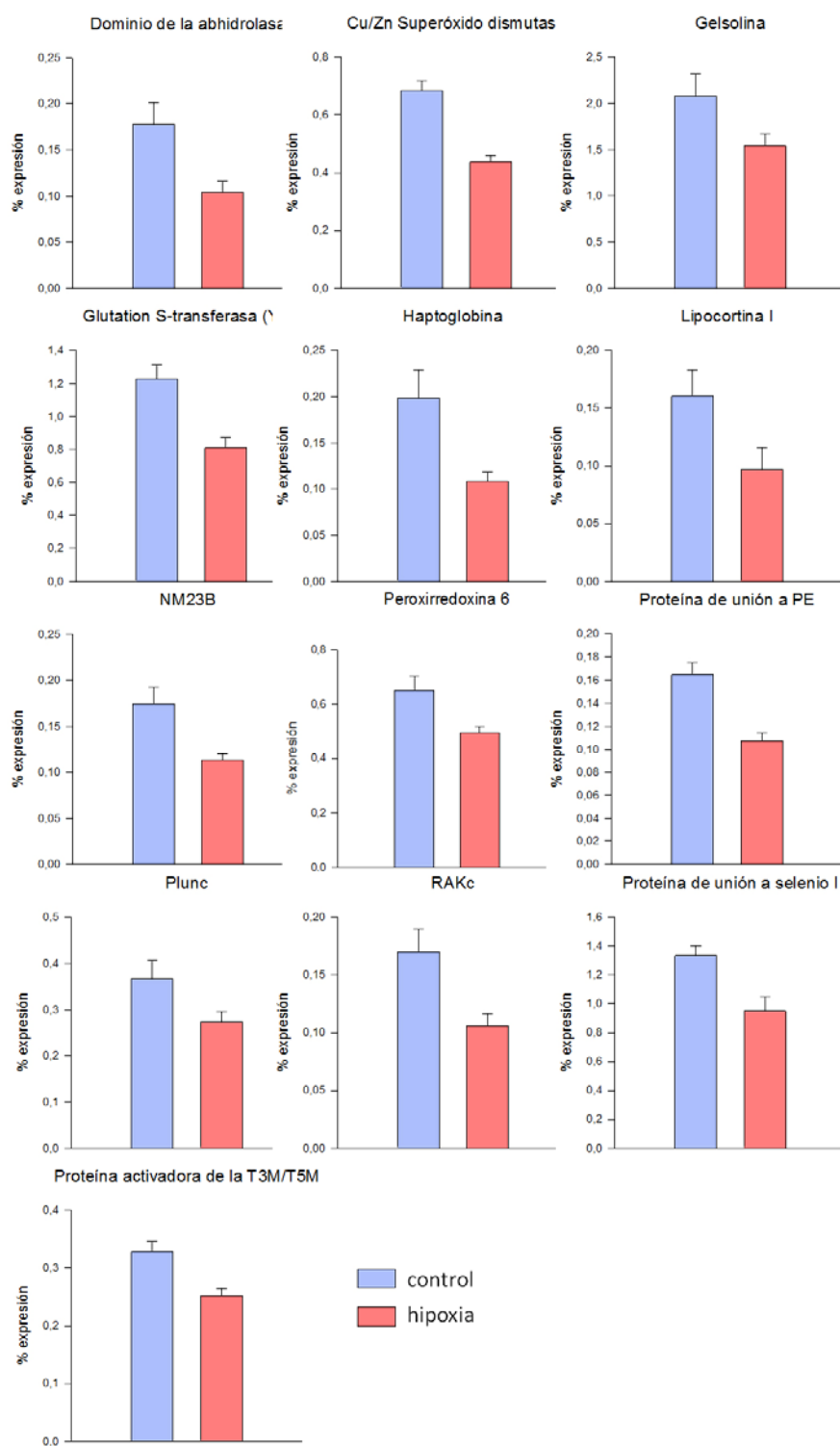


## ANEXO I: Niveles de expresión de las proteínas identificadas en los experimentos de proteómica

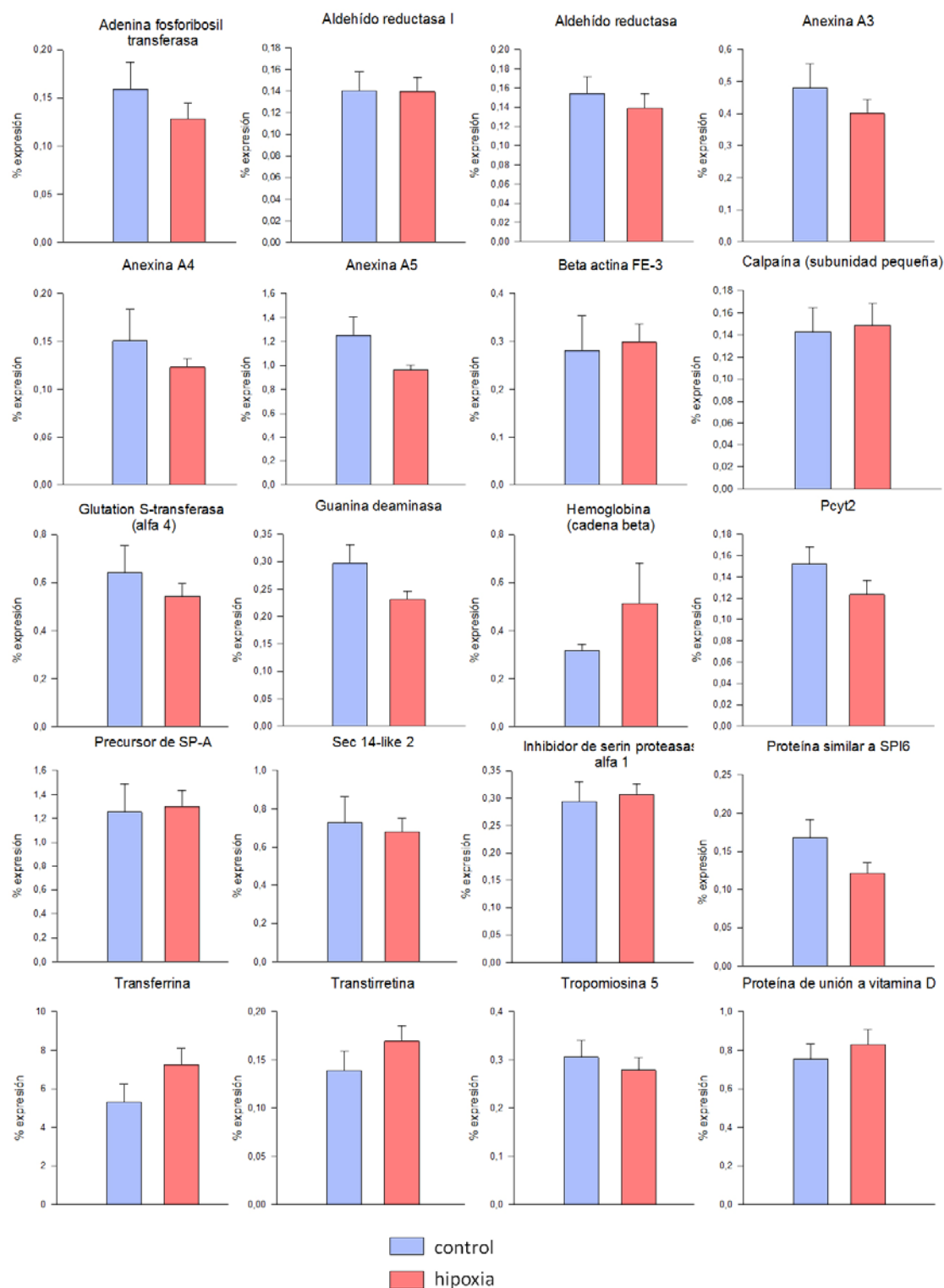
Las gráficas incluidas a continuación muestran los porcentajes de expresión, respecto al total de proteínas, de todas las proteínas identificadas por espectrometría de masas en los geles de 2D-DIGE. Para calcular dichos porcentajes en cada animal se tomó como 100% de expresión la suma de los volúmenes normalizados de todas las proteínas, y tras calcular el porcentaje de expresión de cada proteína sobre el total en cada animal se realizó la media de todos los animales para cada proteína, representándose la media y desviación estándar de este dato en cada uno de los 2 grupos de ratas, control e hipoxia.



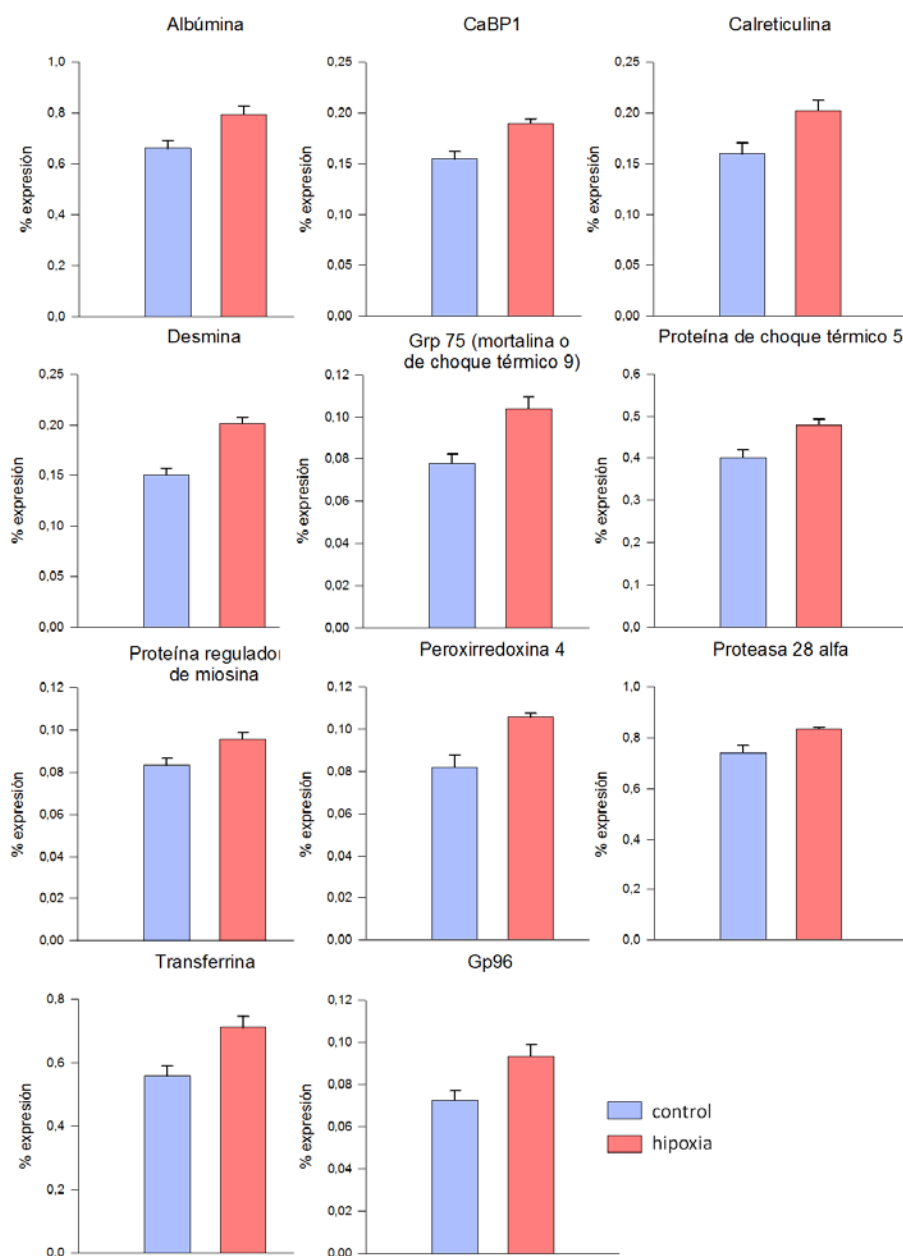
**Figura 102.** Porcentajes de expresión de las proteínas que presentaron un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en su proporción en los lavados alveolares de animales expuestos a hipoxia con respecto a los animales control.



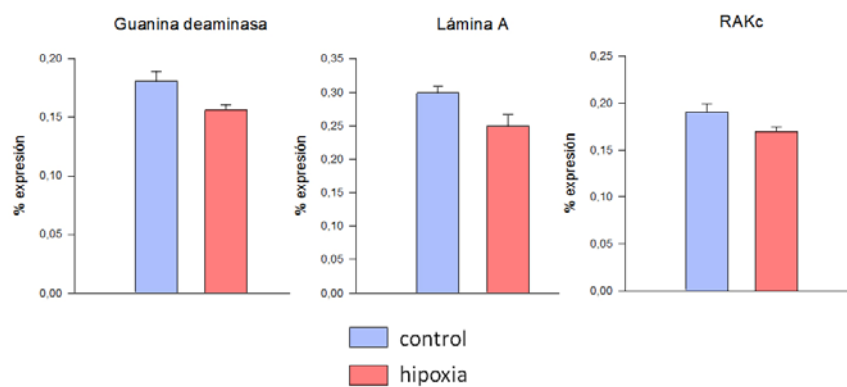
**Figura 103.** Porcentajes de expresión de las proteínas que presentaron una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en su proporción en los lavados alveolares de animales expuestos a hipoxia con respecto a los animales control.



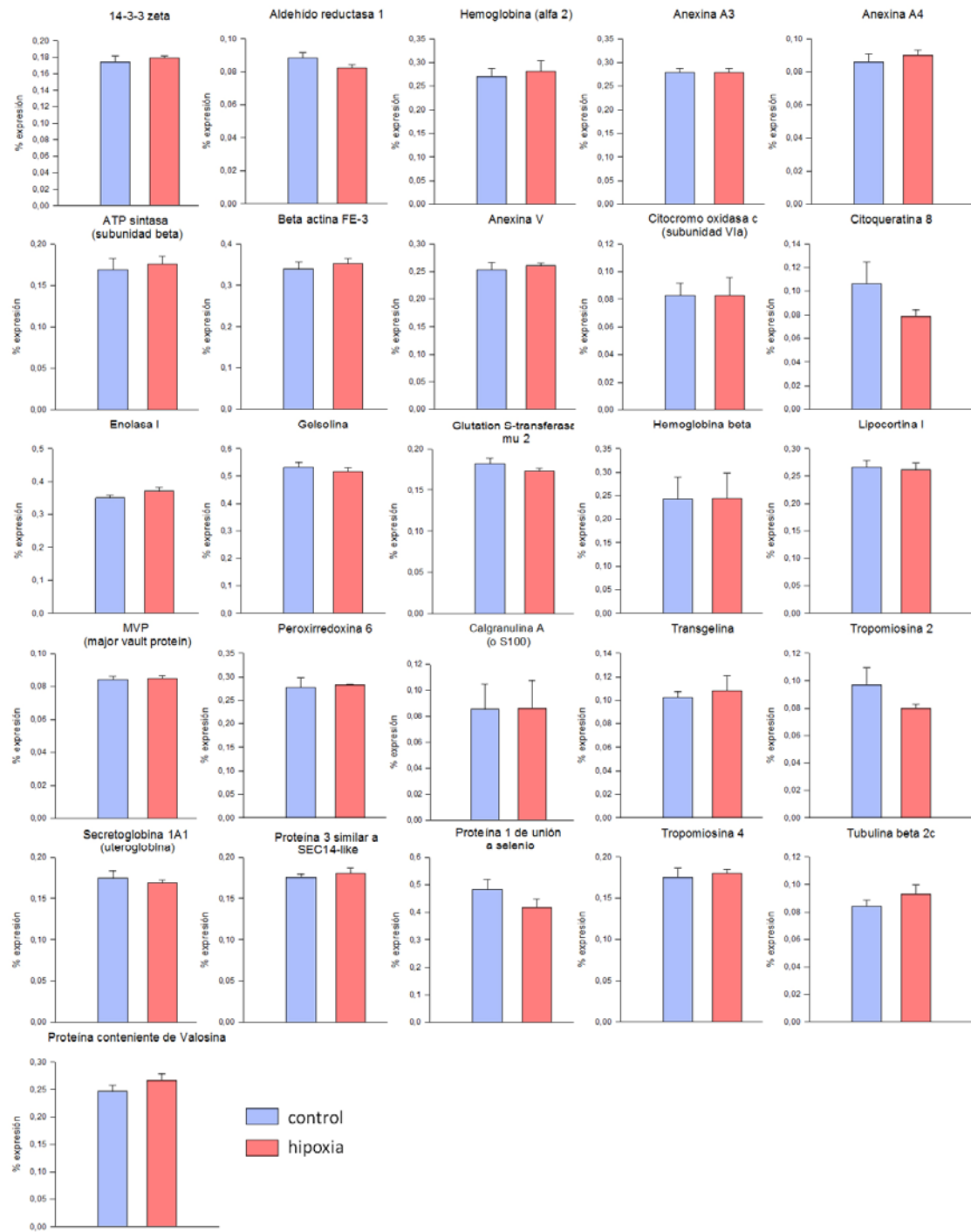
**Figura 104.** Porcentajes de expresión de las proteínas que no presentaron cambios significativos en su proporción en los lavados alveolares de animales expuestos a hipoxia con respecto a los animales control.



**Figura 105.** Porcentajes de expresión de las proteínas que presentaron un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en su proporción en el tejido pulmonar de animales expuestos a hipoxia con respecto a los animales control.



**Figura 106.** Porcentajes de expresión de las proteínas que presentaron una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en su proporción en el tejido pulmonar de animales expuestos a hipoxia con respecto a los animales control.



**Figura 107.** Porcentajes de expresión de las proteínas que no presentaron cambios significativos en su proporción en el tejido pulmonar de animales expuestos a hipoxia con respecto a los animales control.



## ANEXO II: Principales funciones atribuidas a las proteínas identificadas en los experimentos de 2D-DIGE

A continuación se resumen algunas características funcionales de las proteínas identificadas mediante espectrometría de masas y que mostraron cambios significativos en el lavado broncoalveolar o en el tejido pulmonar de ratas sometidas a hipoxia, según los experimentos de 2D-DIGE realizados. Se incluyen también las referencias en las que se basó su clasificación dentro de los cuatro grupos funcionales definidos. Los números en azul se refieren a aumentos significativos en las muestras de los animales sometidos a hipoxia, y los rojos significan disminuciones. Los números que aparecen subrayados y en mayor tamaño corresponden a aquellas proteínas cuyo porcentaje de cambio fue de al menos un 50%, es decir, las proteínas cuya expresión en los animales hipóxicos fue 1.5 veces mayor o menor que en los animales control.

### Lavados broncoalveolares (figura 96)

| Núm              | Proteína                                               | Función                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Referencias                                                                   |
|------------------|--------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1</b>         | <b>Aa2-001</b>                                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína implicada en la regeneración hepática.</li> <li>• Se libera a la sangre en procesos inflamatorios.</li> </ul>                                                                                                                                                                              | (Tizzano y Sbarbati, 2007)                                                    |
| <b><u>2</u></b>  | <b>Proteína con dominio abhidrolasa</b>                | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ciertas proteínas de esta familia están implicadas en la detoxificación, migración de células vasculares y diferenciación de macrófagos.</li> </ul>                                                                                                                                                 | (Li et al., 2009)                                                             |
| <b>4</b>         | <b>Albúmina</b>                                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína hepática con funciones de detoxificación (por unión al hemo), antioxidante y enzimáticas.</li> </ul>                                                                                                                                                                                       | (Fasano et al., 2005)                                                         |
| <b>7</b>         | <b>Precursor del inhibidor alfa-1-antitripsina III</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína hepática inhibidora de serinproteasas, con funciones antiinflamatorias.</li> <li>• Su deficiencia se ha relacionado con la COPD.</li> </ul>                                                                                                                                                | (Greene et al., 2008)                                                         |
| <b>10</b>        | <b>Anexina 5</b>                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína de unión a fosfolípidos y a proteínas del citoesqueleto, con función reguladora de la proliferación de las células endoteliales vasculares.</li> <li>• Su expresión parece aumentar en respuesta a cambios en el estado redox (tanto en hipoxia como en estrés hiperoxidativo).</li> </ul> | (Wen et al., 1999; Gerke y Moss, 2002)                                        |
| <b><u>13</u></b> | <b>Ceruloplasmina</b>                                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína hepática de unión a cobre con actividades tanto pro como antioxidantes.</li> <li>• Su actividad ferroxidasa es esencial para la oxidación del <math>\text{Fe}^{2+}</math> antes de su unión a la transferrina en forma de <math>\text{Fe}^{3+}</math> para su transporte.</li> </ul>       | (Baker et al., 2000; Martin et al., 2005; Healy y Tipton, 2007; White et al., |

|                  |                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                             |
|------------------|----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
|                  |                                                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Debido al aumento de la hematopoyesis y por tanto de la necesidad de un mayor transporte de hierro, la hipoxia induce la expresión de la ceruloplasmina en el hígado.</li> <li>• Se ha encontrado aumentada en pacientes de ARDS, por extravasación plasmática, aunque también es sintetizada en los alveolos en condiciones fisiológicas.</li> </ul> | 2009a)                                      |
| <b>14</b>        | <b>Superóxido dismutasa Cu/Zn</b>                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína con papel citoprotector por su unión al cobre.</li> <li>• Se ha encontrado una disminución de sus niveles en los macrófagos hepáticos como respuesta a la hipoxia.</li> </ul>                                                                                                                                                                | (White et al., 2009a)                       |
| <b>15</b>        | <b>Fetúina beta</b>                                | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína sérica expresada también en pulmón, que parece disminuir en respuesta a estímulos inflamatorios.</li> <li>• Implicación en la angiogénesis.</li> </ul>                                                                                                                                                                                       | (Denecke et al., 2003; Hsu et al., 2004)    |
| <b>16</b>        | <b>Gelsolina</b>                                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína de unión a actina con papel fundamental en la reestructuración del citoesqueleto de la vasculatura pulmonar.</li> <li>• Su expresión aumenta en respuesta a la hipoxia a través de HIF-1.</li> </ul>                                                                                                                                         | (Greijer et al., 2005)                      |
| <b>17</b>        | <b>Subunidad Y-b de la glutatión S-transferasa</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Función antioxidante.</li> <li>• Los niveles de otra isoforma de esta proteína (omega) se encuentran disminuídos en el pulmón y secreciones de los pacientes con COPD.</li> </ul>                                                                                                                                                                     | (Harju et al., 2007)                        |
| <b><u>20</u></b> | <b>Haptoglobina</b>                                | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína plasmática con papel antiinflamatorio y de estimulación de la angiogénesis.</li> <li>• Protege de la toxicidad renal debido a la unión de hemoglobina libre.</li> </ul>                                                                                                                                                                      | (de Kleijn et al., 2002; Ngai et al., 2007) |
| <b>22</b>        | <b>Hemopexina</b>                                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína de unión al hemo por lo que posee papel antioxidante en el pulmón.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                | (Barnard et al., 1993)                      |
| <b><u>23</u></b> | <b>Inter-alfa-inhibidor</b>                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína plasmática con función atenuadora de la inflamación durante el daño pulmonar.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                     | (Garantziotis et al., 2007)                 |
| <b>24</b>        | <b>Lipocortina I o anexina I</b>                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína de unión a fosfolípidos y proteínas del citoesqueleto.</li> <li>• Es sintetizada por los neumocitos tipo II y los macrófagos alveolares, siendo su expresión inducida por los glucocorticoides.</li> <li>• Posee un papel antiinflamatorio debido a su</li> </ul>                                                                            | (Mayran et al., 1996; Gerke y Moss, 2002)   |

|                   |                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                           |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
|                   |                                                                      | capacidad de inhibición de la fosfolipasa PLA <sub>2</sub> .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                           |
| <b>25</b>         | <b>Proteína NM23B</b>                                                | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína quinasa de nucleosidos difosfato.</li> <li>• Se ha encontrado aumentada en muestras de cáncer de pulmón, lo que ha sugerido un papel en la progresión tumoral.</li> </ul>                                                                                                                                                      | (Huwer et al., 1997)                      |
| <b>26</b>         | <b>Proteína Pcyt2</b>                                                | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fosfatidiletanolamina citidiltransferasa.</li> <li>• Proteína implicada la formación de los fosfolípidos derivados de la PE.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                 |                                           |
| <b>27</b>         | <b>Peroxirredoxina 6</b>                                             | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Papel antioxidante debido a su actividad peroxidasa.</li> <li>• Es expresada por las células Clara, los neumocitos tipo II y los macrófagos alveolares, y está implicada en la degradación de la DPPC (por su actividad PLA<sub>2</sub>).</li> <li>• Su actividad es inhibida por la SP-A.</li> </ul>                                   | (Wu et al., 2006; Schremmer et al., 2007) |
| <b>28</b>         | <b>Proteína de unión a PE</b>                                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína inhibidora de serin proteasas.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                      | (Hengst et al., 2001)                     |
| <b>30</b>         | <b>Proteína Plunc</b>                                                | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína secretada por las células epiteliales del tracto respiratorio, implicada en la respuesta inmune innata.</li> <li>• Podría tener cierto papel surfactante en las vías aéreas superiores.</li> <li>• Se ha detectado un aumento de su expresión génica en los pulmones de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática.</li> </ul> | (Boon et al., 2009; Gakhar et al., 2010)  |
| <b>31</b>         | <b>Proteína RAKc</b>                                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína con actividad aldo-keto reductasa.</li> </ul> <p>Implicada en procesos de detoxificación.</p>                                                                                                                                                                                                                                  | (Zeindl-Eberhart et al., 2001)            |
| <b>34</b>         | <b>Proteína de unión a selenio I</b>                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína implicada en el transporte intracelular de selenio, con posible papel antioxidante.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                 | (Meier et al., 2007)                      |
| <b>35, 36, 38</b> | <b>Inhibidores de serinproteasas I, 2b y proteína similar a SPI6</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteínas con importante papel en la defensa pulmonar frente a las infecciones.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                              | (Benarafa et al., 2007)                   |
| <b>42</b>         | <b>Proteína activadora de monooxigenasas</b>                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína implicada en la síntesis de serotonina y catecolaminas.</li> <li>• Papel en la remodelación vascular pulmonar debido a los efectos vasoconstrictores de la serotonina.</li> </ul>                                                                                                                                              | (Laudi et al., 2007)                      |

### Homogeneizados de pulmón (figura 97)

| Núm | Proteína          | Función                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Referencias                                                           |
|-----|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| 10  | Calreticulina     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína implicada en la regulación de calcio.</li> <li>• Sus niveles aumentan en respuesta a la hipoxia en células alveolares en cultivo, produciendo el aumento de la proteína antioxidante tioredoxina.</li> <li>• Se ha encontrado que la SP-A y SP-D se unen a los receptores de calreticulina para modular la inflamación.</li> </ul>                          | (Kuroki et al., 2007; Jia et al., 2008)                               |
| 14  | Desmina           | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína del citoesqueleto importante para mantener la elasticidad pulmonar.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                              | (Shardonofsky et al., 2006)                                           |
| 18  | Grp 75 o HSP9     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Chaperona necesaria para el correcto plegamiento de proteínas mitocondriales.</li> <li>• Está implicada en la respuesta a estrés, en el control de la proliferación celular y en la respuesta inmunitaria.</li> <li>• Su expresión se ha encontrado aumentada como respuesta a un modelo <i>in vitro</i> simulando condiciones de hipoxia.</li> </ul>                | (Wadhwa et al., 2002; Flores-Díaz et al., 2004)                       |
| 19  | Guanina deaminasa | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína implicada en el metabolismo de purinas.</li> <li>• Su disminución podría estar correlacionada con una alteración en la función inmune.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                           | (Moriwaki et al., 1999)                                               |
| 22  | Lámina A          | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína implicada en estabilización de la arquitectura e integridad del núcleo, y relacionada con rutas de señalización celular.</li> <li>• Se ha encontrado una disminución de su expresión en las células bronquiales como respuesta a un modelo inflamatorio de asma, y también se encuentra disminuida en tejido de pacientes con fibrosis pulmonar.</li> </ul> | (Waldburg et al., 2004; Altraja et al., 2009; Wilson y Foisner, 2010) |
| 26  | Peroxirredoxina 4 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Papel antioxidante debido a su actividad peroxidasa.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | (Wu et al., 2006)                                                     |
| 34  | Transferrina      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína hepática de unión a hierro, por lo que posee un papel antioxidante.</li> <li>• Además posee cierta actividad antimicrobiana y está implicada en actividades proliferativas y angiogénicas.</li> </ul>                                                                                                                                                       | (Gomme et al., 2005)                                                  |

## **BIBLIOGRAFÍA**



## BIBLIOGRAFÍA

- Aberg, C., E. Sparr, M. Larsson y H. Wennerstrom (2010). "A theoretical study of diffusional transport over the alveolar surfactant layer." *J R Soc Interface* **7**(51): 1403-10.
- Ahn, V. E., K. F. Faull, J. P. Whitelegge, A. L. Fluharty y G. G. Prive (2003). "Crystal structure of saposin B reveals a dimeric shell for lipid binding." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(1): 38-43.
- Altraja, S., J. Jaama, E. Valk y A. Altraja (2009). "Changes in the proteome of human bronchial epithelial cells following stimulation with leucotriene E4 and transforming growth factor-beta1." *Respirology* **14**(1): 39-45.
- Anderson, D. H., M. R. Sawaya, D. Cascio, W. Ernst, R. Modlin, A. Krensky y D. Eisenberg (2003). "Granulysin crystal structure and a structure-derived lytic mechanism." *J Mol Biol* **325**(2): 355-65.
- Andersson, M., T. Curstedt, H. Jornvall y J. Johansson (1995). "An amphipathic helical motif common to tumourolytic polypeptide NK-lysin and pulmonary surfactant polypeptide SP-B." *FEBS Lett* **362**(3): 328-32.
- Andreeva, A. V., M. A. Kutuzov y T. A. Voyno-Yasenetskaya (2007). "Regulation of surfactant secretion in alveolar type II cells." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **293**(2): L259-71.
- Asikainen, T. M., L. Y. Chang, J. J. Coalson, B. K. Schneider, N. S. Waleh, M. Ikegami, J. M. Shannon, V. T. Winter, P. Grubb, R. I. Clyman, B. A. Yoder, J. D. Crapo y C. W. White (2006). "Improved lung growth and function through hypoxia-inducible factor in primate chronic lung disease of prematurity." *FASEB J* **20**(10): 1698-700.
- Augusto, L. A., M. Synguelakis, J. Johansson, T. Pedron, R. Girard y R. Chaby (2003). "Interaction of pulmonary surfactant protein C with CD14 and lipopolysaccharide." *Infect Immun* **71**(1): 61-7.
- Baatz, J. E., B. Elledge y J. A. Whitsett (1990). "Surfactant protein SP-B induces ordering at the surface of model membrane bilayers." *Biochemistry* **29**(28): 6714-20.
- Baatz, J. E., K. L. Smyth, J. A. Whitsett, C. Baxter y D. R. Absolom (1992). "Structure and functions of a dimeric form of surfactant protein SP-C: a Fourier transform infrared and surfactometry study." *Chem Phys Lipids* **63**(1-2): 91-104.
- Baker, C. S., T. W. Evans y P. L. Haslam (2000). "Measurement of ceruloplasmin in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome: is plasma or local production the major source?" *Respiration* **67**(5): 533-8.
- Banares-Hidalgo, A., A. Bolanos-Gutierrez, F. Gil, E. J. Cabre, J. Perez-Gil y P. Estrada (2008). "Self-aggregation of a recombinant form of the propeptide NH2-terminal of the precursor of pulmonary surfactant protein SP-B: a conformational study." *J Ind Microbiol Biotechnol* **35**(11): 1367-76.
- Barnard, M. L., U. Muller-Eberhard y J. F. Turrens (1993). "Protective role of hemopexin on heme-dependent lung oxidative stress." *Biochem Biophys Res Commun* **192**(1): 82-7.
- Bastacky, J., C. Y. Lee, J. Goerke, H. Koushafar, D. Yager, L. Kenaga, T. P. Speed, Y. Chen y J. A. Clements (1995). "Alveolar lining layer is thin and continuous: low-temperature scanning electron microscopy of rat lung." *J Appl Physiol* **79**(5): 1615-28.
- Battino, R., F. D. Evans y W. F. Danforth (1968). "The solubilities of seven gases in olive oil with reference to theories of transport through the cell membrane." *J Am Oil Chem Soc* **45**(12): 830-3.
- Baumgart, F., O. L. Ospina, I. Mingarro, I. Rodriguez-Crespo y J. Perez-Gil (2010). "Palmitoylation of pulmonary surfactant protein SP-C is critical for its functional cooperation with SP-B to sustain compression/expansion dynamics in cholesterol-containing surfactant films." *Biophys J* **99**(10): 3234-43.

- Beck, D. C., M. Ikegami, C. L. Na, S. Zaltash, J. Johansson, J. A. Whitsett y T. E. Weaver (2000a). "The role of homodimers in surfactant protein B function in vivo." *J Biol Chem* **275**(5): 3365-70.
- Beck, D. C., C. L. Na, J. A. Whitsett y T. E. Weaver (2000b). "Ablation of a critical surfactant protein B intramolecular disulfide bond in transgenic mice." *J Biol Chem* **275**(5): 3371-6.
- Beers, M. F. y S. Mulugeta (2005). "Surfactant protein C biosynthesis and its emerging role in conformational lung disease." *Annu Rev Physiol* **67**: 663-96.
- Benarafa, C., G. P. Priebe y E. Remold-O'Donnell (2007). "The neutrophil serine protease inhibitor serpinb1 preserves lung defense functions in *Pseudomonas aeruginosa* infection." *J Exp Med* **204**(8): 1901-9.
- Bernardino de la Serna, J., G. Oradd, L. A. Bagatolli, A. C. Simonsen, D. Marsh, G. Lindblom y J. Perez-Gil (2009). "Segregated phases in pulmonary surfactant membranes do not show coexistence of lipid populations with differentiated dynamic properties." *Biophys J* **97**(5): 1381-9.
- Bernardino de la Serna, J., J. Perez-Gil, A. C. Simonsen y L. A. Bagatolli (2004). "Cholesterol rules: direct observation of the coexistence of two fluid phases in native pulmonary surfactant membranes at physiological temperatures." *J Biol Chem* **279**(39): 40715-22.
- Bhaskaran, M., H. Chen, Z. Chen y L. Liu (2005). "Hemoglobin is expressed in alveolar epithelial type II cells." *Biochem Biophys Res Commun* **333**(4): 1348-52.
- Blanco, O. y J. Perez-Gil (2007). "Biochemical and pharmacological differences between preparations of exogenous natural surfactant used to treat Respiratory Distress Syndrome: role of the different components in an efficient pulmonary surfactant." *Eur J Pharmacol* **568**(1-3): 1-15.
- Bligh, E. G. y W. J. Dyer (1959). "A rapid method of total lipid extraction and purification." *Can J Biochem Physiol* **37**(8): 911-7.
- Boon, K., N. W. Bailey, J. Yang, M. P. Steel, S. Groshong, D. Kervitsky, K. K. Brown, M. I. Schwarz y D. A. Schwartz (2009). "Molecular phenotypes distinguish patients with relatively stable from progressive idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)." *PLoS One* **4**(4): e5134.
- Bowler, R. P., N. Reisdorph, R. Reisdorph y E. Abraham (2009). "Alterations in the human lung proteome with lipopolysaccharide." *BMC Pulm Med* **9**: 20.
- Brasch, F., G. Johnen, A. Winn-Brasch, S. H. Guttentag, A. Schmiedl, N. Kapp, Y. Suzuki, K. M. Muller, J. Richter, S. Hawgood y M. Ochs (2004). "Surfactant protein B in type II pneumocytes and intra-alveolar surfactant forms of human lungs." *Am J Respir Cell Mol Biol* **30**(4): 449-58.
- Bruhn, H. (2005). "A short guided tour through functional and structural features of saposin-like proteins." *Biochem J* **389**(Pt 2): 249-57.
- Bunger, H., R. P. Kruger, S. Pietschmann, N. Wustneck, L. Kaufner, R. Tschiersch y U. Pison (2001). "Two hydrophobic protein fractions of ovine pulmonary surfactant: isolation, characterization, and biophysical activity." *Protein Expr Purif* **23**(2): 319-27.
- Cabre, E. J., J. Malmstrom, D. Sutherland, J. Perez-Gil y D. E. Otzen (2009). "Surfactant protein SP-B strongly modifies surface collapse of phospholipid vesicles: insights from a quartz crystal microbalance with dissipation." *Biophys J* **97**(3): 768-76.
- Cairns, D. A. (2011). "Statistical issues in quality control of proteomic analyses: Good experimental design and planning." *Proteomics* **11**(6): 1037-48.
- Casals, C. (2001). "Role of surfactant protein A (SP-A)/lipid interactions for SP-A functions in the lung." *Pediatr Pathol Mol Med* **20**(4): 249-68.
- Casals, C., L. Herrera, E. Miguel, P. Garcia-Barreno y A. M. Municio (1989). "Comparison between intra- and extracellular surfactant in respiratory distress induced by oleic acid." *Biochim Biophys Acta* **1003**(2): 201-3.



- Casals, C., E. Miguel y J. Perez-Gil (1993). "Tryptophan fluorescence study on the interaction of pulmonary surfactant protein A with phospholipid vesicles." *Biochem J* **296** ( Pt 3): 585-93.
- Cladera, J., J. L. Rigaud, J. Villaverde y M. Dunach (1997). "Liposome solubilization and membrane protein reconstitution using Chaps and Chapso." *Eur J Biochem* **243**(3): 798-804.
- Clark, J. C., S. E. Wert, C. J. Bachurski, M. T. Stahlman, B. R. Stripp, T. E. Weaver y J. A. Whitsett (1995). "Targeted disruption of the surfactant protein B gene disrupts surfactant homeostasis, causing respiratory failure in newborn mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(17): 7794-8.
- Cochrane, C. G. y S. D. Revak (1991). "Pulmonary surfactant protein B (SP-B): structure-function relationships." *Science* **254**(5031): 566-8.
- Compernelle, V., K. Brusselmans, T. Acker, P. Hoet, M. Tjwa, H. Beck, S. Plaisance, Y. Dor, E. Keshet, F. Lupu, B. Nemery, M. Dewerchin, P. Van Veldhoven, K. Plate, L. Moons, D. Collen y P. Carmeliet (2002). "Loss of HIF-2 $\alpha$  and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice." *Nat Med* **8**(7): 702-10.
- Crouch, E. y J. R. Wright (2001). "Surfactant proteins a and d and pulmonary host defense." *Annu Rev Physiol* **63**: 521-54.
- Crouch, E. C. (2000). "Surfactant protein-D and pulmonary host defense." *Respir Res* **1**(2): 93-108.
- Cruz, A., C. Casals, K. M. Keough y J. Perez-Gil (1997). "Different modes of interaction of pulmonary surfactant protein SP-B in phosphatidylcholine bilayers." *Biochem J* **327** ( Pt 1): 133-8.
- Cruz, A., C. Casals, I. Plasencia, D. Marsh y J. Perez-Gil (1998). "Depth profiles of pulmonary surfactant protein B in phosphatidylcholine bilayers, studied by fluorescence and electron spin resonance spectroscopy." *Biochemistry* **37**(26): 9488-96.
- Cruz, A., L. Vazquez, M. Velez y J. Perez-Gil (2004). "Effect of pulmonary surfactant protein SP-B on the micro- and nanostructure of phospholipid films." *Biophys J* **86**(1 Pt 1): 308-20.
- Cruz, A., L. A. Worthman, A. G. Serrano, C. Casals, K. M. Keough y J. Perez-Gil (2000). "Microstructure and dynamic surface properties of surfactant protein SP-B/dipalmitoylphosphatidylcholine interfacial films spread from lipid-protein bilayers." *Eur Biophys J* **29**(3): 204-13.
- Curstedt, T. y J. Johansson (2010). "Different effects of surfactant proteins B and C - implications for development of synthetic surfactants." *Neonatology* **97**(4): 367-72.
- Curstedt, T., H. Jornvall, B. Robertson, T. Bergman y P. Berggren (1987). "Two hydrophobic low-molecular-mass protein fractions of pulmonary surfactant. Characterization and biophysical activity." *Eur J Biochem* **168**(2): 255-62.
- Chander, A., K. R. Dhariwal, R. Viswanathan y T. A. Venkatasubramanian (1977). "Effect of acute hypobaric hypoxia on fatty acid metabolism in rat lung." *Respiration* **34**(4): 205-12.
- Chander, A., R. Viswanathan y T. A. Venkatasubramanian (1975). "Effect of acute hypobaric hypoxia on 32-P incorporation into phospholipids of alveolar surfactant, lung, liver and plasma of rat." *Environ Physiol Biochem* **5**(1): 27-36.
- Chavarha, M., H. Khoojinian, L. E. Schulwitz, Jr., S. C. Biswas, S. B. Ranavavare y S. B. Hall (2010). "Hydrophobic surfactant proteins induce a phosphatidylethanolamine to form cubic phases." *Biophys J* **98**(8): 1549-57.
- Chen, J. W., C. Dodia, S. I. Feinstein, M. K. Jain y A. B. Fisher (2000). "1-Cys peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A2 activities." *J Biol Chem* **275**(37): 28421-7.

- Daniels, C. B., O. V. Lopatko y S. Orgeig (1998). "Evolution of surface activity related functions of vertebrate pulmonary surfactant." *Clin Exp Pharmacol Physiol* **25**(9): 716-21.
- Daniels, C. B. y S. Orgeig (2001). "The comparative biology of pulmonary surfactant: past, present and future." *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **129**(1): 9-36.
- Daniels, C. B. y S. Orgeig (2003). "Pulmonary surfactant: the key to the evolution of air breathing." *News Physiol Sci* **18**: 151-7.
- de Kleijn, D. P., M. B. Smeets, P. P. Kemmeren, S. K. Lim, B. J. Van Middelaar, E. Velema, A. Schoneveld, G. Pasterkamp y C. Borst (2002). "Acute-phase protein haptoglobin is a cell migration factor involved in arterial restructuring." *FASEB J* **16**(9): 1123-5.
- de la Maza, A. y J. L. Parra (1997). "Solubilizing effects caused by the nonionic surfactant dodecylmaltoside in phosphatidylcholine liposomes." *Biophys J* **72**(4): 1668-75.
- Denecke, B., S. Graber, C. Schafer, A. Heiss, M. Woltje y W. Jahn-Dechent (2003). "Tissue distribution and activity testing suggest a similar but not identical function of fetuin-B and fetuin-A." *Biochem J* **376**(Pt 1): 135-45.
- Dietl, P., T. Haller, N. Mair y M. Frick (2001). "Mechanisms of surfactant exocytosis in alveolar type II cells in vitro and in vivo." *News Physiol Sci* **16**: 239-43.
- Discher, B. M., K. M. Maloney, W. R. Schief, Jr., D. W. Grainger, V. Vogel y S. B. Hall (1996). "Lateral phase separation in interfacial films of pulmonary surfactant." *Biophys J* **71**(5): 2583-90.
- Dluhy, R. A., S. Shanmukh, J. B. Leapard, P. Kruger y J. E. Baatz (2003). "Deacylated pulmonary surfactant protein SP-C transforms from alpha-helical to amyloid fibril structure via a pH-dependent mechanism: an infrared structural investigation." *Biophys J* **85**(4): 2417-29.
- Dombrowsky, H., T. Tschernig, G. Vieten, G. A. Rau, F. Ohler, C. Acevedo, C. Behrens, C. F. Poets, H. von der Hardt y W. Bernhard (2006). "Molecular and functional changes of pulmonary surfactant in response to hyperoxia." *Pediatr Pulmonol* **41**(11): 1025-39.
- Fasano, M., S. Curry, E. Terreno, M. Galliano, G. Fanali, P. Narciso, S. Notari y P. Ascenzi (2005). "The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin." *IUBMB Life* **57**(12): 787-96.
- Fischkoff, S. y J. M. Vanderkooi (1975). "Oxygen diffusion in biological and artificial membranes determined by the fluorochrome pyrene." *J Gen Physiol* **65**(5): 663-76.
- Fisher, A. B. (2011). "Peroxiredoxin 6: A Bifunctional Enzyme with Glutathione Peroxidase and Phospholipase A(2) Activities." *Antioxid Redox Signal*.
- Fisher, A. B. y C. Dodia (2001). "Lysosomal-type PLA2 and turnover of alveolar DPPC." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **280**(4): L748-54.
- Flach, C. R., P. Cai, D. Dieudonne, J. W. Brauner, K. M. Keough, J. Stewart y R. Mendelsohn (2003). "Location of structural transitions in an isotopically labeled lung surfactant SP-B peptide by IRRAS." *Biophys J* **85**(1): 340-9.
- Flores-Diaz, M., J. C. Higueta, I. Florin, T. Okada, P. Pollesello, T. Bergman, M. Thelestam, K. Mori y A. Alape-Giron (2004). "A cellular UDP-glucose deficiency causes overexpression of glucose/oxygen-regulated proteins independent of the endoplasmic reticulum stress elements." *J Biol Chem* **279**(21): 21724-31.
- Floros, J., G. Wang y A. N. Mikerov (2009). "Genetic complexity of the human innate host defense molecules, surfactant protein A1 (SP-A1) and SP-A2--impact on function." *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **19**(2): 125-37.
- Follows, D., F. Tiberg, R. K. Thomas y M. Larsson (2007). "Multilayers at the surface of solutions of exogenous lung surfactant: direct observation by neutron reflection." *Biochim Biophys Acta* **1768**(2): 228-35.
- Foster, C. D., P. X. Zhang, L. W. Gonzales y S. H. Guttentag (2003). "In vitro surfactant protein B deficiency inhibits lamellar body formation." *Am J Respir Cell Mol Biol* **29**(2): 259-66.

- Fullagar, W. K., K. A. Aberdeen, D. G. Bucknall, P. A. Kroon y I. R. Gentle (2003). "Conformational changes in SP-B as a function of surface pressure." *Biophys J* **85**(4): 2624-32.
- Gakhar, L., J. A. Bartlett, J. Penterman, D. Mizrahi, P. K. Singh, R. K. Mallampalli, S. Ramaswamy y P. B. McCray, Jr. (2010). "PLUNC is a novel airway surfactant protein with anti-biofilm activity." *PLoS One* **5**(2): e9098.
- Ganter, C. C., S. M. Jakob y J. Takala (2006). "Pulmonary capillary pressure. A review." *Minerva Anestesiol* **72**(1-2): 21-36.
- Garantziotis, S., J. W. Hollingsworth, R. B. Ghanayem, S. Timberlake, L. Zhuo, K. Kimata y D. A. Schwartz (2007). "Inter-alpha-trypsin inhibitor attenuates complement activation and complement-induced lung injury." *J Immunol* **179**(6): 4187-92.
- Garavito, R. M. y S. Ferguson-Miller (2001). "Detergents as tools in membrane biochemistry." *J Biol Chem* **276**(35): 32403-6.
- Garzon, J. I., J. Kovacs, R. Abagyan y P. Chacon (2007). "ADP-EM: fast exhaustive multi-resolution docking for high-throughput coverage." *Bioinformatics* **23**(4): 427-33.
- Gericke, A., C. R. Flach y R. Mendelsohn (1997). "Structure and orientation of lung surfactant SP-C and L-alpha-dipalmitoylphosphatidylcholine in aqueous monolayers." *Biophys J* **73**(1): 492-9.
- Gerke, V. y S. E. Moss (2002). "Annexins: from structure to function." *Physiol Rev* **82**(2): 331-71.
- Glasser, S. W., E. A. Detmer, M. Ikegami, C. L. Na, M. T. Stahlman y J. A. Whitsett (2003). "Pneumonitis and emphysema in sp-C gene targeted mice." *J Biol Chem* **278**(16): 14291-8.
- Goerke, J. (1998). "Pulmonary surfactant: functions and molecular composition." *Biochim Biophys Acta* **1408**(2-3): 79-89.
- Gomez-Gil, L., D. Schurch, E. Goormaghtigh y J. Perez-Gil (2009). "Pulmonary surfactant protein SP-C counteracts the deleterious effects of cholesterol on the activity of surfactant films under physiologically relevant compression-expansion dynamics." *Biophys J* **97**(10): 2736-45.
- Gomme, P. T., K. B. McCann y J. Bertolini (2005). "Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions." *Drug Discov Today* **10**(4): 267-73.
- Gonzalez-Horta, A., D. Andreu, M. R. Morrow y J. Perez-Gil (2008). "Effects of palmitoylation on dynamics and phospholipid-bilayer-perturbing properties of the N-terminal segment of pulmonary surfactant protein SP-C as shown by 2H-NMR." *Biophys J* **95**(5): 2308-17.
- Gonzalez, N. C. y J. G. Wood (2010). "Alveolar hypoxia-induced systemic inflammation: what low PO(2) does and does not do." *Adv Exp Med Biol* **662**: 27-32.
- Gordon, L. M., S. Horvath, M. L. Longo, J. A. Zasadzinski, H. W. Taeusch, K. Faull, C. Leung y A. J. Waring (1996). "Conformation and molecular topography of the N-terminal segment of surfactant protein B in structure-promoting environments." *Protein Sci* **5**(8): 1662-75.
- Gortner, L., A. Hilgendorff, T. Bahner, M. Ebsen, I. Reiss y S. Rudloff (2005). "Hypoxia-induced intrauterine growth retardation: effects on pulmonary development and surfactant protein transcription." *Biol Neonate* **88**(2): 129-35.
- Greene, C. M., S. D. Miller, T. Carroll, C. McLean, M. O'Mahony, M. W. Lawless, S. J. O'Neill, C. C. Taggart y N. G. McElvaney (2008). "Alpha-1 antitrypsin deficiency: a conformational disease associated with lung and liver manifestations." *J Inherit Metab Dis* **31**(1): 21-34.
- Greijer, A. E., P. van der Groep, D. Kemming, A. Shvarts, G. L. Semenza, G. A. Meijer, M. A. van de Wiel, J. A. Belien, P. J. van Diest y E. van der Wall (2005). "Up-regulation of gene

- expression by hypoxia is mediated predominantly by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1)." *J Pathol* **206**(3): 291-304.
- Grek, C. L., D. A. Newton, D. D. Spyropoulos y J. E. Baatz (2010). "Hypoxia Upregulates Expression of Hemoglobin in Alveolar Epithelial Cells." *Am J Respir Cell Mol Biol*.
- Gunasekara, L., S. Schurch, W. M. Schoel, K. Nag, Z. Leonenko, M. Haufs y M. Amrein (2005). "Pulmonary surfactant function is abolished by an elevated proportion of cholesterol." *Biochim Biophys Acta* **1737**(1): 27-35.
- Gunther, A., C. Ruppert, R. Schmidt, P. Markart, F. Grimminger, D. Walmrath y W. Seeger (2001). "Surfactant alteration and replacement in acute respiratory distress syndrome." *Respir Res* **2**(6): 353-64.
- Gustafsson, M., G. Vandenbussche, T. Curstedt, J. M. Ruyschaert y J. Johansson (1996). "The 21-residue surfactant peptide (LysLeu4)4Lys(KL4) is a transmembrane alpha-helix with a mixed nonpolar/polar surface." *FEBS Lett* **384**(2): 185-8.
- Guthmann, F., B. Harrach-Ruprecht, A. C. Looman, P. A. Stevens, H. Robenek y B. Rustow (1997). "Interaction of lipoproteins with type II pneumocytes in vitro: morphological studies, uptake kinetics and secretion rate of cholesterol." *Eur J Cell Biol* **74**(2): 197-207.
- Gutsmann, T., B. Riekens, H. Bruhn, A. Wiese, U. Seydel y M. Leippe (2003). "Interaction of amoebapores and NK-lysin with symmetric phospholipid and asymmetric lipopolysaccharide/phospholipid bilayers." *Biochemistry* **42**(32): 9804-12.
- Guttentag, S. (2008). "Posttranslational regulation of surfactant protein B expression." *Semin Perinatol* **32**(5): 367-70.
- Guyton, A. C. y J. E. Hall (2000). *Textbook of medical physiology*. Philadelphia, P. A., W. B. Saunders Company.
- Haagsman, H. P. (2002). "Structural and functional aspects of the collectin SP-A." *Immunobiology* **205**(4-5): 476-89.
- Haagsman, H. P., A. Hogenkamp, M. van Eijk y E. J. Veldhuizen (2008). "Surfactant collectins and innate immunity." *Neonatology* **93**(4): 288-94.
- Habler, O. P. y K. F. Messmer (1997). "The physiology of oxygen transport." *Transfus Sci* **18**(3): 425-35.
- Hakansson, K., N. K. Lim, H. J. Hoppe y K. B. Reid (1999). "Crystal structure of the trimeric alpha-helical coiled-coil and the three lectin domains of human lung surfactant protein D." *Structure* **7**(3): 255-64.
- Harju, T. H., M. J. Peltoniemi, P. H. Ryttilä, Y. Soini, K. M. Salmenkivi, P. G. Board, L. W. Ruddock y V. L. Kinnula (2007). "Glutathione S-transferase omega in the lung and sputum supernatants of COPD patients." *Respir Res* **8**: 48.
- Hawgood, S., M. Derrick y F. Poulain (1998). "Structure and properties of surfactant protein B." *Biochim Biophys Acta* **1408**(2-3): 150-60.
- Head, J. F., T. R. Mealy, F. X. McCormack y B. A. Seaton (2003). "Crystal structure of trimeric carbohydrate recognition and neck domains of surfactant protein A." *J Biol Chem* **278**(44): 43254-60.
- Healy, J. y K. Tipton (2007). "Ceruloplasmin and what it might do." *J Neural Transm* **114**(6): 777-81.
- Hecht, O., N. A. Van Nuland, K. Schleinkofer, A. J. Dingley, H. Bruhn, M. Leippe y J. Grotzinger (2004). "Solution structure of the pore-forming protein of *Entamoeba histolytica*." *J Biol Chem* **279**(17): 17834-41.
- Hengst, U., H. Albrecht, D. Hess y D. Monard (2001). "The phosphatidylethanolamine-binding protein is the prototype of a novel family of serine protease inhibitors." *J Biol Chem* **276**(1): 535-40.

- Herzog, E. L., A. R. Brody, T. V. Colby, R. Mason y M. C. Williams (2008). "Knowns and unknowns of the alveolus." *Proc Am Thorac Soc* **5**(7): 778-82.
- Heukeshoven, J. y R. Dernick (1988). "Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels." *Electrophoresis* **9**(1): 28-32.
- Hickling, T. P., R. Malhotra y R. B. Sim (1998). "Human lung surfactant protein A exists in several different oligomeric states: oligomer size distribution varies between patient groups." *Mol Med* **4**(4): 266-75.
- Hills, B. A. (1999). "An alternative view of the role(s) of surfactant and the alveolar model." *J Appl Physiol* **87**(5): 1567-83.
- Holm, B. A., G. Enhörning y R. H. Notter (1988). "A biophysical mechanism by which plasma proteins inhibit lung surfactant activity." *Chem Phys Lipids* **49**(1-2): 49-55.
- Hsu, S. J., H. Nagase y A. Balmain (2004). "Identification of Fetuin-B as a member of a cystatin-like gene family on mouse chromosome 16 with tumor suppressor activity." *Genome* **47**(5): 931-46.
- Huwer, H., G. Kalweit, M. Engel, C. Welter, S. Dooley y E. Gams (1997). "Expression of the candidate tumor suppressor gene nm23 in the bronchial system of patients with squamous cell lung cancer." *Eur J Cardiothorac Surg* **11**(2): 206-9.
- Ikegami, M., S. Grant, T. Korfhagen, R. K. Scheule y J. A. Whitsett (2009). "Surfactant protein-D regulates the postnatal maturation of pulmonary surfactant lipid pool sizes." *J Appl Physiol* **106**(5): 1545-52.
- Ikegami, M., C. L. Na, T. R. Korfhagen y J. A. Whitsett (2005). "Surfactant protein D influences surfactant ultrastructure and uptake by alveolar type II cells." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **288**(3): L552-61.
- Ikegami, M., N. Takabatake y T. E. Weaver (2002). "Intersubunit disulfide bridge is not required for the protective role of SP-B against lung inflammation." *J Appl Physiol* **93**(2): 505-11.
- Ishikawa, N., S. Ohlmeier, K. Salmenkivi, M. Myllarniemi, I. Rahman, W. Mazur y V. L. Kinnula (2010). "Hemoglobin alpha and beta are ubiquitous in the human lung, decline in idiopathic pulmonary fibrosis but not in COPD." *Respir Res* **11**(1): 123.
- Ivanov, I., G. E. Fedorov, R. A. Gus'kova, K. I. Ivanov y A. B. Rubin (2004). "Permeability of lipid membranes to dioxygen." *Biochem Biophys Res Commun* **322**(3): 746-50.
- Jain, M. y J. I. Sznajder (2005). "Effects of hypoxia on the alveolar epithelium." *Proc Am Thorac Soc* **2**(3): 202-5.
- Jia, L., M. Xu, W. Zhen, X. Shen, Y. Zhu, W. Wang y X. Wang (2008). "Novel anti-oxidative role of calreticulin in protecting A549 human type II alveolar epithelial cells against hypoxic injury." *Am J Physiol Cell Physiol* **294**(1): C47-55.
- Jiménez Cabré, E. (2009). Determinantes y efectos de la integración de la proteína SP-B del surfactante pulmonar en membranas lipídicas. *Bioquímica y Biología Molecular I*. Madrid, Universidad Complutense de Madrid.
- Johansson, J. (2003). "Molecular determinants for amyloid fibril formation: lessons from lung surfactant protein C." *Swiss Med Wkly* **133**(19-20): 275-82.
- Johansson, J. y T. Curstedt (1997). "Molecular structures and interactions of pulmonary surfactant components." *Eur J Biochem* **244**(3): 675-93.
- Johansson, J., T. Szyperki, T. Curstedt y K. Wuthrich (1994). "The NMR structure of the pulmonary surfactant-associated polypeptide SP-C in an apolar solvent contains a valyl-rich alpha-helix." *Biochemistry* **33**(19): 6015-23.
- Johnson, M. D. (2007). "Ion transport in alveolar type I cells." *Mol Biosyst* **3**(3): 178-86.
- Kairys, V., M. K. Gilson y B. Luy (2004). "Structural model for an AxxxG-mediated dimer of surfactant-associated protein C." *Eur J Biochem* **271**(11): 2086-92.

- Karp, N. A. y K. S. Lilley (2007). "Design and analysis issues in quantitative proteomics studies." *Proteomics* **7 Suppl 1**: 42-50.
- Kelly, S. M. y N. C. Price (1997). "The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding." *Biochim Biophys Acta* **1338**(2): 161-85.
- Kishimoto, Y., M. Hiraiwa y J. S. O'Brien (1992). "Saposins: structure, function, distribution, and molecular genetics." *J Lipid Res* **33**(9): 1255-67.
- Korfhagen, T. R., M. D. Bruno, G. F. Ross, K. M. Huelsman, M. Ikegami, A. H. Jobe, S. E. Wert, B. R. Stripp, R. E. Morris, S. W. Glasser, C. J. Bachurski, H. S. Iwamoto y J. A. Whitsett (1996). "Altered surfactant function and structure in SP-A gene targeted mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(18): 9594-9.
- Krause, F. (2006). "Detection and analysis of protein-protein interactions in organellar and prokaryotic proteomes by native gel electrophoresis: (Membrane) protein complexes and supercomplexes." *Electrophoresis* **27**(13): 2759-81.
- Krol, S., M. Ross, M. Sieber, S. Kunneke, H. J. Galla y A. Janshoff (2000). "Formation of three-dimensional protein-lipid aggregates in monolayer films induced by surfactant protein B." *Biophys J* **79**(2): 904-18.
- Kuroki, Y., M. Takahashi y C. Nishitani (2007). "Pulmonary collectins in innate immunity of the lung." *Cell Microbiol* **9**(8): 1871-9.
- Kuronuma, K., H. Mitsuzawa, K. Takeda, C. Nishitani, E. D. Chan, Y. Kuroki, M. Nakamura y D. R. Voelker (2009). "Anionic pulmonary surfactant phospholipids inhibit inflammatory responses from alveolar macrophages and U937 cells by binding the lipopolysaccharide-interacting proteins CD14 and MD-2." *J Biol Chem* **284**(38): 25488-500.
- Kurutz, J. W. y K. Y. Lee (2002). "NMR structure of lung surfactant peptide SP-B(11-25)." *Biochemistry* **41**(30): 9627-36.
- Ladanyi, E., R. C. Ahuja, D. Mobius y K. Stalder (1992). "Oxygen transport through a model lung surfactant surface layer: influence of the film compression on the kinetics." *Adv Exp Med Biol* **317**: 343-7.
- Lang, C. J., A. D. Postle, S. Orgeig, F. Possmayer, W. Bernhard, A. K. Panda, K. D. Jurgens, W. K. Milsom, K. Nag y C. B. Daniels (2005). "Dipalmitoylphosphatidylcholine is not the major surfactant phospholipid species in all mammals." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **289**(5): R1426-39.
- Laudi, S., W. Steudel, K. Jonscher, W. Schoning, B. Schniedewind, U. Kaisers, U. Christians y S. Trump (2007). "Comparison of lung proteome profiles in two rodent models of pulmonary arterial hypertension." *Proteomics* **7**(14): 2469-78.
- Leippe, M., H. Bruhn, O. Hecht y J. Grotzinger (2005). "Ancient weapons: the three-dimensional structure of amoebapore A." *Trends Parasitol* **21**(1): 5-7.
- Lewis, J. F., M. Ikegami y A. H. Jobe (1990). "Altered surfactant function and metabolism in rabbits with acute lung injury." *J Appl Physiol* **69**(6): 2303-10.
- Lewis, J. F. y R. Veldhuizen (2003). "The role of exogenous surfactant in the treatment of acute lung injury." *Annu Rev Physiol* **65**: 613-42.
- Li, F., X. Fei, J. Xu y C. Ji (2009). "An unannotated alpha/beta hydrolase superfamily member, ABHD6 differentially expressed among cancer cell lines." *Mol Biol Rep* **36**(4): 691-6.
- Liepinsh, E., M. Andersson, J. M. Ruysschaert y G. Otting (1997). "Saposin fold revealed by the NMR structure of NK-lysin." *Nat Struct Biol* **4**(10): 793-5.
- Lin, P. M. y J. R. Wright (2006). "Surfactant protein A binds to IgG and enhances phagocytosis of IgG-opsonized erythrocytes." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **291**(6): L1199-206.
- Lipp, M. M., K. Y. Lee, J. A. Zasadzinski y A. J. Waring (1996). "Phase and morphology changes in lipid monolayers induced by SP-B protein and its amino-terminal peptide." *Science* **273**(5279): 1196-9.

- Liu, L., M. Zeng y J. S. Stamler (1999). "Hemoglobin induction in mouse macrophages." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(12): 6643-7.
- Livak, K. J. y T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* **25**(4): 402-8.
- Lopez-Barneo, J., R. Pardal y P. Ortega-Saenz (2001). "Cellular mechanism of oxygen sensing." *Annu Rev Physiol* **63**: 259-87.
- Lopez-Rodriguez, E., M. Echaide, A. Cruz, H. W. Taeusch y J. Perez-Gil (2011). "Meconium impairs pulmonary surfactant by a combined action of cholesterol and bile acids." *Biophys J* **100**(3): 646-55.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr y R. J. Randall (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *J Biol Chem* **193**(1): 265-75.
- Luy, B., A. Diener, R. P. Hummel, E. Sturm, W. R. Ulrich y C. Griesinger (2004). "Structure and potential C-terminal dimerization of a recombinant mutant of surfactant-associated protein C in chloroform/methanol." *Eur J Biochem* **271**(11): 2076-85.
- Magi, B., E. Bargagli, L. Bini y P. Rottoli (2006). "Proteome analysis of bronchoalveolar lavage in lung diseases." *Proteomics* **6**(23): 6354-69.
- Maina, J. N. y J. B. West (2005). "Thin and strong! The bioengineering dilemma in the structural and functional design of the blood-gas barrier." *Physiol Rev* **85**(3): 811-44.
- Mairbaur, H. (2006). "Role of alveolar epithelial sodium transport in high altitude pulmonary edema (HAPE)." *Respir Physiol Neurobiol* **151**(2-3): 178-91.
- Mansergh, F. C., S. M. Hunter, J. C. Geatrell, M. Jarrin, K. Powell, M. J. Evans y M. A. Wride (2008). "Developmentally regulated expression of hemoglobin subunits in avascular tissues." *Int J Dev Biol* **52**(7): 873-86.
- Markart, P., C. Ruppert, M. Wygrecka, T. Colaris, B. Dahal, D. Walmrath, H. Harbach, J. Wilhelm, W. Seeger, R. Schmidt y A. Guenther (2007). "Patients with ARDS show improvement but not normalisation of alveolar surface activity with surfactant treatment: putative role of neutral lipids." *Thorax* **62**(7): 588-94.
- Martin, F., T. Linden, D. M. Katschinski, F. Oehme, I. Flamme, C. K. Mukhopadhyay, K. Eckhardt, J. Troger, S. Barth, G. Camenisch y R. H. Wenger (2005). "Copper-dependent activation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1: implications for ceruloplasmin regulation." *Blood* **105**(12): 4613-9.
- Martinez-Gil, L., J. Perez-Gil y I. Mingarro (2008). "The surfactant peptide KL4 sequence is inserted with a transmembrane orientation into the endoplasmic reticulum membrane." *Biophys J* **95**(6): L36-8.
- Mason, J. M. y K. M. Arndt (2004). "Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications." *Chembiochem* **5**(2): 170-6.
- Massaro, G. D. y D. Massaro (1983). "Morphologic evidence that large inflations of the lung stimulate secretion of surfactant." *Am Rev Respir Dis* **127**(2): 235-6.
- Mayran, N., V. Traverso, S. Maroux y D. Massey-Harroche (1996). "Cellular and subcellular localizations of annexins I, IV, and VI in lung epithelia." *Am J Physiol* **270**(5 Pt 1): L863-71.
- Meier, B. W., J. D. Gomez, O. V. Kirichenko y J. A. Thompson (2007). "Mechanistic basis for inflammation and tumor promotion in lungs of 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol-treated mice: electrophilic metabolites alkylate and inactivate antioxidant enzymes." *Chem Res Toxicol* **20**(2): 199-207.
- Melton, K. R., L. L. Nessel, M. Ikegami, J. W. Tichelaar, J. C. Clark, J. A. Whitsett y T. E. Weaver (2003). "SP-B deficiency causes respiratory failure in adult mice." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **285**(3): L543-9.
- Meyer, K. C. y J. J. Zimmerman (2002). "Inflammation and surfactant." *Paediatr Respir Rev* **3**(4): 308-14.

- Mingarro, I., D. Lukovic, M. Vilar y J. Perez-Gil (2008). "Synthetic pulmonary surfactant preparations: new developments and future trends." Curr Med Chem **15**(4): 393-403.
- Miteva, M., M. Andersson, A. Karshikoff y G. Otting (1999). "Molecular electroporation: a unifying concept for the description of membrane pore formation by antibacterial peptides, exemplified with NK-lysin." FEBS Lett **462**(1-2): 155-8.
- Moriwaki, Y., T. Yamamoto y K. Higashino (1999). "Enzymes involved in purine metabolism--a review of histochemical localization and functional implications." Histol Histopathol **14**(4): 1321-40.
- Morrow, M. R., J. Perez-Gil, G. Simatos, C. Boland, J. Stewart, D. Absolom, V. Sarin y K. M. Keough (1993). "Pulmonary surfactant-associated protein SP-B has little effect on acyl chains in dipalmitoylphosphatidylcholine dispersions." Biochemistry **32**(16): 4397-402.
- Morrow, M. R., J. Stewart, S. Taneva, A. Dico y K. M. Keough (2004). "Perturbation of DPPC bilayers by high concentrations of pulmonary surfactant protein SP-B." Eur Biophys J **33**(4): 285-90.
- Morrow, M. R., S. Temple, J. Stewart y K. M. Keough (2007). "Comparison of DPPC and DPPG environments in pulmonary surfactant models." Biophys J **93**(1): 164-75.
- Mulugeta, S. y M. F. Beers (2003). "Processing of surfactant protein C requires a type II transmembrane topology directed by juxtamembrane positively charged residues." J Biol Chem **278**(48): 47979-86.
- Munford, R. S., P. O. Sheppard y P. J. O'Hara (1995). "Saposin-like proteins (SAPLIP) carry out diverse functions on a common backbone structure." J Lipid Res **36**(8): 1653-63.
- Na Nakorn, P., M. C. Meyer, C. R. Flach, R. Mendelsohn y H. J. Galla (2007). "Surfactant protein C and lung function: new insights into the role of alpha-helical length and palmitoylation." Eur Biophys J **36**(4-5): 477-89.
- Nag, K., J. G. Munro, S. A. Hearn, J. Rasmusson, N. O. Petersen y F. Possmayer (1999). "Correlated atomic force and transmission electron microscopy of nanotubular structures in pulmonary surfactant." J Struct Biol **126**(1): 1-15.
- Nag, K., J. Perez-Gil, A. Cruz y K. M. Keough (1996a). "Fluorescently labeled pulmonary surfactant protein C in spread phospholipid monolayers." Biophys J **71**(1): 246-56.
- Nag, K., J. Perez-Gil, A. Cruz, N. H. Rich y K. M. Keough (1996b). "Spontaneous formation of interfacial lipid-protein monolayers during adsorption from vesicles." Biophys J **71**(3): 1356-63.
- Nag, K., S. G. Taneva, J. Perez-Gil, A. Cruz y K. M. Keough (1997). "Combinations of fluorescently labeled pulmonary surfactant proteins SP-B and SP-C in phospholipid films." Biophys J **72**(6): 2638-50.
- Newton, D. A., K. M. Rao, R. A. Dluhy y J. E. Baatz (2006). "Hemoglobin is expressed by alveolar epithelial cells." J Biol Chem **281**(9): 5668-76.
- Ngai, H. H., W. H. Sit, P. P. Jiang, V. Thongboonkerd y J. M. Wan (2007). "Markedly increased urinary preprohaptoglobin and haptoglobin in passive Heymann nephritis: a differential proteomics approach." J Proteome Res **6**(8): 3313-20.
- Nishi, H., R. Inagi, H. Kato, M. Tanemoto, I. Kojima, D. Son, T. Fujita y M. Nangaku (2008). "Hemoglobin is expressed by mesangial cells and reduces oxidant stress." J Am Soc Nephrol **19**(8): 1500-8.
- Nogee, L. M. (1998). "Genetics of the hydrophobic surfactant proteins." Biochim Biophys Acta **1408**(2-3): 323-33.
- Nogee, L. M., D. E. de Mello, L. P. Dehner y H. R. Colten (1993). "Brief report: deficiency of pulmonary surfactant protein B in congenital alveolar proteinosis." N Engl J Med **328**(6): 406-10.



- Nogee, L. M., J. R. Wispe, J. C. Clark, T. E. Weaver y J. A. Whitsett (1991). "Increased expression of pulmonary surfactant proteins in oxygen-exposed rats." Am J Respir Cell Mol Biol **4**(2): 102-7.
- Notter, R. H. (2000). Lung Surfactants: Basic Science and Clinical Applications. New York, Marcel Dekker, Inc.
- O'Brien, J. S. y Y. Kishimoto (1991). "Saposin proteins: structure, function, and role in human lysosomal storage disorders." FASEB J **5**(3): 301-8.
- Obladen, M., D. Popp, C. Scholl, H. Schwarz y F. Jahnig (1983). "Studies on lung surfactant replacement in respiratory distress syndrome. Rapid film formation from binary mixed liposomes." Biochim Biophys Acta **735**(2): 215-24.
- Ochs, M., J. R. Nyengaard, A. Jung, L. Knudsen, M. Voigt, T. Wahlers, J. Richter y H. J. Gundersen (2004). "The number of alveoli in the human lung." Am J Respir Crit Care Med **169**(1): 120-4.
- Oosterlaken-Dijksterhuis, M. A., M. van Eijk, B. L. van Buel, L. M. van Golde y H. P. Haagsman (1991). "Surfactant protein composition of lamellar bodies isolated from rat lung." Biochem J **274** ( Pt 1): 115-9.
- Orgeig, S. y C. B. Daniels (2001). "The roles of cholesterol in pulmonary surfactant: insights from comparative and evolutionary studies." Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **129**(1): 75-89.
- Orgeig, S., P. S. Hiemstra, E. J. Veldhuizen, C. Casals, H. W. Clark, A. Haczku, L. Knudsen y F. Possmayer (2010). "Recent advances in alveolar biology: evolution and function of alveolar proteins." Respir Physiol Neurobiol **173** Suppl: S43-54.
- Osanai, K., C. Tsuchihara, R. Hatta, T. Oikawa, K. Tsuchihara, M. Iguchi, T. Seki, M. Takahashi, J. Huang y H. Toga (2006). "Pulmonary surfactant transport in alveolar type II cells." Respirology **11** Suppl: S70-3.
- Palmer, L. A., G. L. Semenza, M. H. Stoler y R. A. Johns (1998). "Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1." Am J Physiol **274**(2 Pt 1): L212-9.
- Panda, A. K., K. Nag, R. R. Harbottle, K. Rodriguez-Capote, R. A. Veldhuizen, N. O. Petersen y F. Possmayer (2004). "Effect of acute lung injury on structure and function of pulmonary surfactant films." Am J Respir Cell Mol Biol **30**(5): 641-50.
- Pastva, A. M., J. R. Wright y K. L. Williams (2007). "Immunomodulatory roles of surfactant proteins A and D: implications in lung disease." Proc Am Thorac Soc **4**(3): 252-7.
- Patthy, L. (1991). "Homology of the precursor of pulmonary surfactant-associated protein SP-B with prosaposin and sulfated glycoprotein 1." J Biol Chem **266**(10): 6035-7.
- Pelton, J. T. y L. R. McLean (2000). "Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure." Anal Biochem **277**(2): 167-76.
- Perez-Gil, J. (2001). "Lipid-protein interactions of hydrophobic proteins SP-B and SP-C in lung surfactant assembly and dynamics." Pediatr Pathol Mol Med **20**(6): 445-69.
- Perez-Gil, J. (2002). "Molecular interactions in pulmonary surfactant films." Biol Neonate **81** Suppl 1: 6-15.
- Perez-Gil, J. (2008). "Structure of pulmonary surfactant membranes and films: the role of proteins and lipid-protein interactions." Biochim Biophys Acta **1778**(7-8): 1676-95.
- Perez-Gil, J., C. Casals y D. Marsh (1995). "Interactions of hydrophobic lung surfactant proteins SP-B and SP-C with dipalmitoylphosphatidylcholine and dipalmitoylphosphatidylglycerol bilayers studied by electron spin resonance spectroscopy." Biochemistry **34**(12): 3964-71.
- Perez-Gil, J., A. Cruz y C. Casals (1993). "Solubility of hydrophobic surfactant proteins in organic solvent/water mixtures. Structural studies on SP-B and SP-C in aqueous organic solvents and lipids." Biochim Biophys Acta **1168**(3): 261-70.

- Perez-Gil, J. y K. M. Keough (1998). "Interfacial properties of surfactant proteins." Biochim Biophys Acta **1408**(2-3): 203-17.
- Perez-Gil, J. y T. E. Weaver (2010). "Pulmonary surfactant pathophysiology: current models and open questions." Physiology (Bethesda) **25**(3): 132-41.
- Piknova, B., W. R. Schief, V. Vogel, B. M. Discher y S. B. Hall (2001). "Discrepancy between phase behavior of lung surfactant phospholipids and the classical model of surfactant function." Biophys J **81**(4): 2172-80.
- Piknova, B., V. Schram y S. B. Hall (2002). "Pulmonary surfactant: phase behavior and function." Curr Opin Struct Biol **12**(4): 487-94.
- Plasencia, I., F. Baumgart, D. Andreu, D. Marsh y J. Perez-Gil (2008). "Effect of acylation on the interaction of the N-Terminal segment of pulmonary surfactant protein SP-C with phospholipid membranes." Biochim Biophys Acta **1778**(5): 1274-82.
- Possmayer, F., K. Nag, K. Rodriguez, R. Qanbar y S. Schurch (2001). "Surface activity in vitro: role of surfactant proteins." Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **129**(1): 209-20.
- Poulain, F. R., L. Allen, M. C. Williams, R. L. Hamilton y S. Hawgood (1992). "Effects of surfactant apolipoproteins on liposome structure: implications for tubular myelin formation." Am J Physiol **262**(6 Pt 1): L730-9.
- Prive, G. G. (2007). "Detergents for the stabilization and crystallization of membrane proteins." Methods **41**(4): 388-97.
- Putman, E., L. A. Creuwels, L. M. van Golde y H. P. Haagsman (1996). "Surface properties, morphology and protein composition of pulmonary surfactant subtypes." Biochem J **320** ( Pt 2): 599-605.
- Raoul, W., B. Chailley-Heu, A. M. Barlier-Mur, C. Delacourt, B. Maitre y J. R. Bourbon (2004). "Effects of vascular endothelial growth factor on isolated fetal alveolar type II cells." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **286**(6): L1293-301.
- Rassler, B., G. Marx, C. Reissig, M. A. Rohling, A. Tannapfel, R. H. Wenger y H. G. Zimmer (2007). "Time course of hypoxia-induced lung injury in rats." Respir Physiol Neurobiol **159**(1): 45-54.
- Ravasio, A., B. Olmeda, C. Bertocchi, T. Haller y J. Perez-Gil (2010). "Lamellar bodies form solid 3-dimensional films at the respiratory air-liquid interface." J Biol Chem.
- Reeves, J. T. (2002). "High adventure in pulmonary hypertension: acute and chronic hypoxia are not the same." Am J Respir Crit Care Med **166**(12 Pt 1): 1537-8.
- Richter, F., B. H. Meurers, C. Zhu, V. P. Medvedeva y M. F. Chesselet (2009). "Neurons express hemoglobin alpha- and beta-chains in rat and human brains." J Comp Neurol **515**(5): 538-47.
- Rigaud, J. L., G. Mosser, J. J. Lacapere, A. Olofsson, D. Levy y J. L. Ranck (1997). "Bio-Beads: an efficient strategy for two-dimensional crystallization of membrane proteins." J Struct Biol **118**(3): 226-35.
- Roderick, S. L., W. W. Chan, D. S. Agate, L. R. Olsen, M. W. Vetting, K. R. Rajashankar y D. E. Cohen (2002). "Structure of human phosphatidylcholine transfer protein in complex with its ligand." Nat Struct Biol **9**(7): 507-11.
- Rodriguez-Capote, K., K. Nag, S. Schurch y F. Possmayer (2001). "Surfactant protein interactions with neutral and acidic phospholipid films." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **281**(1): L231-42.
- Rooney, S. A., S. L. Young y C. R. Mendelson (1994). "Molecular and cellular processing of lung surfactant." FASEB J **8**(12): 957-67.
- Rouser, G., A. N. Siakotos y S. Fleischer (1966). "Quantitative analysis of phospholipids by thin-layer chromatography and phosphorus analysis of spots." Lipids **1**(1): 85-6.

- Rugonyi, S., S. C. Biswas y S. B. Hall (2008). "The biophysical function of pulmonary surfactant." *Respir Physiol Neurobiol* **163**(1-3): 244-55.
- Ryan, M. A., H. T. Akinbi, A. G. Serrano, J. Perez-Gil, H. Wu, F. X. McCormack y T. E. Weaver (2006). "Antimicrobial activity of native and synthetic surfactant protein B peptides." *J Immunol* **176**(1): 416-25.
- Ryan, M. A., X. Qi, A. G. Serrano, M. Ikegami, J. Perez-Gil, J. Johansson y T. E. Weaver (2005). "Mapping and analysis of the lytic and fusogenic domains of surfactant protein B." *Biochemistry* **44**(3): 861-72.
- Saini, Y., J. R. Harkema y J. J. LaPres (2008). "HIF1alpha is essential for normal intrauterine differentiation of alveolar epithelium and surfactant production in the newborn lung of mice." *J Biol Chem* **283**(48): 33650-7.
- Sanchez-Barbero, F., G. Rivas, W. Steinhilber y C. Casals (2007). "Structural and functional differences among human surfactant proteins SP-A1, SP-A2 and co-expressed SP-A1/SP-A2: role of supratrimeric oligomerization." *Biochem J* **406**(3): 479-89.
- Sanchez-Barbero, F., J. Strassner, R. Garcia-Canero, W. Steinhilber y C. Casals (2005). "Role of the degree of oligomerization in the structure and function of human surfactant protein A." *J Biol Chem* **280**(9): 7659-70.
- Sández Macho, M. I., A. Gil González y A. Suárez Varela (2000). "Photophysical study of pyrene-labeled phospholipids at the gas/water interface." *Langmuir* **16**(24): 9347-9351.
- Sarker, M., D. Jackman y V. Booth (2011). "Lung Surfactant Protein A (SP-A) Interactions with Model Lung Surfactant Lipids and an SP-B Fragment." *Biochemistry*.
- Schagger, H. y G. von Jagow (1991). "Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form." *Anal Biochem* **199**(2): 223-31.
- Schechter, A. N. (2008). "Hemoglobin research and the origins of molecular medicine." *Blood* **112**(10): 3927-38.
- Schief, W. R., M. Antia, B. M. Discher, S. B. Hall y V. Vogel (2003). "Liquid-crystalline collapse of pulmonary surfactant monolayers." *Biophys J* **84**(6): 3792-806.
- Schoel, W. M., S. Schurch y J. Goerke (1994). "The captive bubble method for the evaluation of pulmonary surfactant: surface tension, area, and volume calculations." *Biochim Biophys Acta* **1200**(3): 281-90.
- Schouten, A., B. Agianian, J. Westerman, J. Kroon, K. W. Wirtz y P. Gros (2002). "Structure of apo-phosphatidylinositol transfer protein alpha provides insight into membrane association." *EMBO J* **21**(9): 2117-21.
- Schremmer, B., Y. Manevich, S. I. Feinstein y A. B. Fisher (2007). "Peroxiredoxins in the lung with emphasis on peroxiredoxin VI." *Subcell Biochem* **44**: 317-44.
- Schurch, D., O. L. Ospina, A. Cruz y J. Perez-Gil (2010). "Combined and independent action of proteins SP-B and SP-C in the surface behavior and mechanical stability of pulmonary surfactant films." *Biophys J* **99**(10): 3290-9.
- Schurch, S., H. Bachofen y F. Possmayer (2001). "Surface activity in situ, in vivo, and in the captive bubble surfactometer." *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **129**(1): 195-207.
- Schurch, S., F. H. Green y H. Bachofen (1998). "Formation and structure of surface films: captive bubble surfactometry." *Biochim Biophys Acta* **1408**(2-3): 180-202.
- Schurholz, T. (1996). "Critical dependence of the solubilization of lipid vesicles by the detergent CHAPS on the lipid composition. Functional reconstitution of the nicotinic acetylcholine receptor into preformed vesicles above the critical micellization concentration." *Biophys Chem* **58**(1-2): 87-96.
- Schurholz, T., J. Kehne, A. Gieselmann y E. Neumann (1992). "Functional reconstitution of the nicotinic acetylcholine receptor by CHAPS dialysis depends on the concentrations of salt, lipid, and protein." *Biochemistry* **31**(21): 5067-77.

- Seddon, A. M., P. Curnow y P. J. Booth (2004). "Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera." *Biochim Biophys Acta* **1666**(1-2): 105-17.
- Semenza, G. L. (2005). "Pulmonary vascular responses to chronic hypoxia mediated by hypoxia-inducible factor 1." *Proc Am Thorac Soc* **2**(1): 68-70.
- Serrano, A. G., E. J. Cabre y J. Perez-Gil (2007). "Identification of a segment in the precursor of pulmonary surfactant protein SP-B, potentially involved in pH-dependent membrane assembly of the protein." *Biochim Biophys Acta* **1768**(5): 1059-69.
- Serrano, A. G., A. Cruz, K. Rodriguez-Capote, F. Possmayer y J. Perez-Gil (2005). "Intrinsic structural and functional determinants within the amino acid sequence of mature pulmonary surfactant protein SP-B." *Biochemistry* **44**(1): 417-30.
- Serrano, A. G. y J. Perez-Gil (2006). "Protein-lipid interactions and surface activity in the pulmonary surfactant system." *Chem Phys Lipids* **141**(1-2): 105-18.
- Serrano, A. G., M. Ryan, T. E. Weaver y J. Perez-Gil (2006). "Critical structure-function determinants within the N-terminal region of pulmonary surfactant protein SP-B." *Biophys J* **90**(1): 238-49.
- Shardonofsky, F. R., Y. Capetanaki y A. M. Boriek (2006). "Desmin modulates lung elastic recoil and airway responsiveness." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **290**(5): L890-6.
- Shiffer, K., S. Hawgood, H. P. Haagsman, B. Benson, J. A. Clements y J. Goerke (1993). "Lung surfactant proteins, SP-B and SP-C, alter the thermodynamic properties of phospholipid membranes: a differential calorimetry study." *Biochemistry* **32**(2): 590-7.
- Silvius, J. R. (1992). "Solubilization and functional reconstitution of biomembrane components." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **21**: 323-48.
- Sohma, H., N. Matsushima, T. Watanabe, A. Hattori, Y. Kuroki y T. Akino (1995). "Ca(2+)-dependent binding of annexin IV to surfactant protein A and lamellar bodies in alveolar type II cells." *Biochem J* **312** ( Pt 1): 175-81.
- Spragg, R. G., J. F. Lewis, W. Wurst, D. Hafner, R. P. Baughman, M. D. Wewers y J. J. Marsh (2003). "Treatment of acute respiratory distress syndrome with recombinant surfactant protein C surfactant." *Am J Respir Crit Care Med* **167**(11): 1562-6.
- Stahlman, M. T., V. Besnard, S. E. Wert, T. E. Weaver, S. Dingle, Y. Xu, K. von Zychlin, S. J. Olson y J. A. Whitsett (2007). "Expression of ABCA3 in developing lung and other tissues." *J Histochem Cytochem* **55**(1): 71-83.
- Stevens, P. A., H. Wissel, S. Zastrow, D. Sieger y K. P. Zimmer (2001). "Surfactant protein A and lipid are internalized via the coated-pit pathway by type II pneumocytes." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **280**(1): L141-51.
- Storz, J. F. y H. Moriyama (2008). "Mechanisms of hemoglobin adaptation to high altitude hypoxia." *High Alt Med Biol* **9**(2): 148-57.
- Suzuki, S., M. Noda, M. Sugita, S. Ono, K. Koike y S. Fujimura (1999). "Impairment of transalveolar fluid transport and lung Na(+)-K(+)-ATPase function by hypoxia in rats." *J Appl Physiol* **87**(3): 962-8.
- Suzuki, Y., Y. Fujita y K. Kogishi (1989). "Reconstitution of tubular myelin from synthetic lipids and proteins associated with pig pulmonary surfactant." *Am Rev Respir Dis* **140**(1): 75-81.
- Szebeni, J., H. Hauser, C. D. Eskelson, R. R. Watson y K. H. Winterhalter (1988). "Interaction of hemoglobin derivatives with liposomes. Membrane cholesterol protects against the changes of hemoglobin." *Biochemistry* **27**(17): 6425-34.
- Taeusch, H. W., J. Bernardino de la Serna, J. Perez-Gil, C. Alonso y J. A. Zasadzinski (2005). "Inactivation of pulmonary surfactant due to serum-inhibited adsorption and reversal by hydrophilic polymers: experimental." *Biophys J* **89**(3): 1769-79.
- Takahashi, H., Y. Kuroki, M. Morita y N. Tabata (1989). "Studies on asphyxia: lipids in the alveoli of rats in hypoxic state." *Forensic Sci Int* **42**(3): 215-20.

- Takahashi, K., Y. Kimura, K. Nagata, A. Yamamoto, M. Matsuo y K. Ueda (2005). "ABC proteins: key molecules for lipid homeostasis." Med Mol Morphol **38**(1): 2-12.
- Taneva, S. y K. M. Keough (1994). "Pulmonary surfactant proteins SP-B and SP-C in spread monolayers at the air-water interface: III. Proteins SP-B plus SP-C with phospholipids in spread monolayers." Biophys J **66**(4): 1158-66.
- Taneva, S. y K. M. Keough (1997). "Cholesterol modifies the properties of surface films of dipalmitoylphosphatidylcholine plus pulmonary surfactant-associated protein B or C spread or adsorbed at the air-water interface." Biochemistry **36**(4): 912-22.
- Taneva, S. G. y K. M. Keough (2000). "Adsorption of pulmonary surfactant protein SP-A to monolayers of phospholipids containing hydrophobic surfactant protein SP-B or SP-C: potential differential role for tertiary interaction of lipids, hydrophobic proteins, and SP-A." Biochemistry **39**(20): 6083-93.
- Teng, X., D. Li, H. C. Champion y R. A. Johns (2003). "FIZZ1/RELMalpha, a novel hypoxia-induced mitogenic factor in lung with vasoconstrictive and angiogenic properties." Circ Res **92**(10): 1065-7.
- Tizzano, M. y A. Sbarbati (2007). "Is rat LRRP Ba1-651 a Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase activated by changes in the concentration of sweet molecules?" Med Hypotheses **68**(4): 864-7.
- Tolle, A., W. Meier, M. Rudiger, K. P. Hofmann y B. Rustow (2002). "Effect of cholesterol and surfactant protein B on the viscosity of phospholipid mixtures." Chem Phys Lipids **114**(2): 159-68.
- Tong, Q., L. Zheng, J. Dodd-o, J. Langer, D. Wang y D. Li (2006a). "Hypoxia-induced mitogenic factor modulates surfactant protein B and C expression in mouse lung." Am J Respir Cell Mol Biol **34**(1): 28-38.
- Tong, Q., L. Zheng, B. Li, D. Wang, C. Huang, G. M. Matuschak y D. Li (2006b). "Hypoxia-induced mitogenic factor enhances angiogenesis by promoting proliferation and migration of endothelial cells." Exp Cell Res **312**(18): 3559-69.
- Uchida, T., F. Rossignol, M. A. Matthay, R. Mounier, S. Couette, E. Clottes y C. Clerici (2004). "Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1alpha." J Biol Chem **279**(15): 14871-8.
- Umstead, T. M., W. M. Freeman, V. M. Chinchilli y D. S. Phelps (2009). "Age-related changes in the expression and oxidation of bronchoalveolar lavage proteins in the rat." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **296**(1): L14-29.
- Vaccaro, A. M., R. Salvioli, A. Barca, M. Tatti, F. Ciaffoni, B. Maras, R. Siciliano, F. Zappacosta, A. Amoresano y P. Pucci (1995). "Structural analysis of saposin C and B. Complete localization of disulfide bridges." J Biol Chem **270**(17): 9953-60.
- Vaccaro, A. M., R. Salvioli, M. Tatti y F. Ciaffoni (1999). "Saposins and their interaction with lipids." Neurochem Res **24**(2): 307-14.
- Vandenbussche, G., A. Clercx, M. Clercx, T. Curstedt, J. Johansson, H. Jornvall y J. M. Ruysschaert (1992a). "Secondary structure and orientation of the surfactant protein SP-B in a lipid environment. A Fourier transform infrared spectroscopy study." Biochemistry **31**(38): 9169-76.
- Vandenbussche, G., A. Clercx, T. Curstedt, J. Johansson, H. Jornvall y J. M. Ruysschaert (1992b). "Structure and orientation of the surfactant-associated protein C in a lipid bilayer." Eur J Biochem **203**(1-2): 201-9.
- Vaporidi, K., C. Tsatsanis, D. Georgopoulos y P. N. Tschlis (2005). "Effects of hypoxia and hypercapnia on surfactant protein expression proliferation and apoptosis in A549 alveolar epithelial cells." Life Sci **78**(3): 284-93.

- Veldhuizen, R., K. Nag, S. Orgeig y F. Possmayer (1998). "The role of lipids in pulmonary surfactant." Biochim Biophys Acta **1408**(2-3): 90-108.
- Veldhuizen, R. A., L. A. McCaig, T. Akino y J. F. Lewis (1995). "Pulmonary surfactant subfractions in patients with the acute respiratory distress syndrome." Am J Respir Crit Care Med **152**(6 Pt 1): 1867-71.
- Voorhout, W. F., T. Veenendaal, H. P. Haagsman, A. J. Verkleij, L. M. van Golde y H. J. Geuze (1991). "Surfactant protein A is localized at the corners of the pulmonary tubular myelin lattice." J Histochem Cytochem **39**(10): 1331-6.
- Wadhwa, R., K. Taira y S. C. Kaul (2002). "An Hsp70 family chaperone, mortalin/mthsp70/PBP74/Grp75: what, when, and where?" Cell Stress Chaperones **7**(3): 309-16.
- Waldburg, N., T. Kahne, A. Reisenauer, C. Rocken, T. Welte y F. Buhling (2004). "Clinical proteomics in lung diseases." Pathol Res Pract **200**(2): 147-54.
- Walters, R. W., R. R. Jenq y S. B. Hall (2000). "Distinct steps in the adsorption of pulmonary surfactant to an air-liquid interface." Biophys J **78**(1): 257-66.
- Wang, Y., K. M. Rao y E. Demchuk (2003). "Topographical organization of the N-terminal segment of lung pulmonary surfactant protein B (SP-B(1-25)) in phospholipid bilayers." Biochemistry **42**(14): 4015-27.
- Warriner, H. E., J. Ding, A. J. Waring y J. A. Zasadzinski (2002). "A concentration-dependent mechanism by which serum albumin inactivates replacement lung surfactants." Biophys J **82**(2): 835-42.
- Wattiez, R. y P. Falmagne (2005). "Proteomics of bronchoalveolar lavage fluid." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **815**(1-2): 169-78.
- Weaver, T. E. (1998). "Synthesis, processing and secretion of surfactant proteins B and C." Biochim Biophys Acta **1408**(2-3): 173-9.
- Weaver, T. E. y J. J. Conkright (2001). "Function of surfactant proteins B and C." Annu Rev Physiol **63**: 555-78.
- Weaver, T. E. y J. A. Whitsett (1991). "Function and regulation of expression of pulmonary surfactant-associated proteins." Biochem J **273**(Pt 2): 249-64.
- Weibel, E. R. (2009). "What makes a good lung?" Swiss Med Wkly **139**(27-28): 375-86.
- Weir, E. K., J. Lopez-Barneo, K. J. Buckler y S. L. Archer (2005). "Acute oxygen-sensing mechanisms." N Engl J Med **353**(19): 2042-55.
- Wen, Y., J. L. Edelman, T. Kang y G. Sachs (1999). "Lipocortin V may function as a signaling protein for vascular endothelial growth factor receptor-2/Flk-1." Biochem Biophys Res Commun **258**(3): 713-21.
- White, C., T. Kambe, Y. G. Fulcher, S. W. Sachdev, A. I. Bush, K. Fritsche, J. Lee, T. P. Quinn y M. J. Petris (2009a). "Copper transport into the secretory pathway is regulated by oxygen in macrophages." J Cell Sci **122**(Pt 9): 1315-21.
- White, C., J. Lee, T. Kambe, K. Fritsche y M. J. Petris (2009b). "A role for the ATP7A copper-transporting ATPase in macrophage bactericidal activity." J Biol Chem **284**(49): 33949-56.
- White, C. W., K. E. Greene, C. B. Allen y J. M. Shannon (2001). "Elevated expression of surfactant proteins in newborn rats during adaptation to hyperoxia." Am J Respir Cell Mol Biol **25**(1): 51-9.
- Wikenheiser, K. A., S. E. Wert, J. R. Wispe, M. Stahlman, M. D'Amore-Bruno, G. Singh, S. L. Katyal y J. A. Whitsett (1992). "Distinct effects of oxygen on surfactant protein B expression in bronchiolar and alveolar epithelium." Am J Physiol **262**(1 Pt 1): L32-9.
- Wilson, K. L. y R. Foisner (2010). "Lamin-binding Proteins." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(4): a000554.

- Williams, M. C. (1977). "Conversion of lamellar body membranes into tubular myelin in alveoli of fetal rat lungs." *J Cell Biol* **72**(2): 260-77.
- Wirtz, H. R. y L. G. Dobbs (1990). "Calcium mobilization and exocytosis after one mechanical stretch of lung epithelial cells." *Science* **250**(4985): 1266-9.
- Wiswell, T. E., R. M. Smith, L. B. Katz, L. Mastroianni, D. Y. Wong, D. Willms, S. Heard, M. Wilson, R. D. Hite, A. Anzueto, S. D. Revak y C. G. Cochrane (1999). "Bronchopulmonary segmental lavage with Surfaxin (KL(4)-surfactant) for acute respiratory distress syndrome." *Am J Respir Crit Care Med* **160**(4): 1188-95.
- Wittig, I. y H. Schagger (2005). "Advantages and limitations of clear-native PAGE." *Proteomics* **5**(17): 4338-46.
- Wodopia, R., H. S. Ko, J. Billian, R. Wiesner, P. Bartsch y H. Mairbaurl (2000). "Hypoxia decreases proteins involved in epithelial electrolyte transport in A549 cells and rat lung." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**(6): L1110-9.
- Wright, J. R. (1997). "Immunomodulatory functions of surfactant." *Physiol Rev* **77**(4): 931-62.
- Wright, J. R. (2003). "Pulmonary surfactant: a front line of lung host defense." *J Clin Invest* **111**(10): 1453-5.
- Wright, J. R. (2005). "Immunoregulatory functions of surfactant proteins." *Nat Rev Immunol* **5**(1): 58-68.
- Wu, W., N. B. Dave, G. Yu, P. J. Strollo, E. Kovkarova-Naumovski, S. W. Ryter, S. R. Reeves, E. Dayyat, Y. Wang, A. M. Choi, D. Gozal y N. Kaminski (2008). "Network analysis of temporal effects of intermittent and sustained hypoxia on rat lungs." *Physiol Genomics* **36**(1): 24-34.
- Wu, Y. Z., Y. Manevich, J. L. Baldwin, C. Dodia, K. Yu, S. I. Feinstein y A. B. Fisher (2006). "Interaction of surfactant protein A with peroxiredoxin 6 regulates phospholipase A2 activity." *J Biol Chem* **281**(11): 7515-25.
- Wustneck, N., R. Wustneck, J. Perez-Gil y U. Pison (2003). "Effects of oligomerization and secondary structure on the surface behavior of pulmonary surfactant proteins SP-B and SP-C." *Biophys J* **84**(3): 1940-9.
- Wustneck, R., J. Perez-Gil, N. Wustneck, A. Cruz, V. B. Fainerman y U. Pison (2005). "Interfacial properties of pulmonary surfactant layers." *Adv Colloid Interface Sci* **117**(1-3): 33-58.
- Yang, L., J. Johansson, R. Ridsdale, H. Willander, M. Fitzen, H. T. Akinbi y T. E. Weaver (2009). "Surfactant protein B propeptide contains a saposin-like protein domain with antimicrobial activity at low pH." *J Immunol* **184**(2): 975-83.
- Zaltash, S., W. J. Griffiths, D. Beck, C. X. Duan, T. E. Weaver y J. Johansson (2001). "Membrane activity of (Cys48Ser) lung surfactant protein B increases with dimerisation." *Biol Chem* **382**(6): 933-9.
- Zaltash, S. y J. Johansson (1998). "Secondary structure and limited proteolysis give experimental evidence that the precursor of pulmonary surfactant protein B contains three saposin-like domains." *FEBS Lett* **423**(1): 1-4.
- Zaltash, S., M. Palmblad, T. Curstedt, J. Johansson y B. Persson (2000). "Pulmonary surfactant protein B: a structural model and a functional analogue." *Biochim Biophys Acta* **1466**(1-2): 179-86.
- Zeindl-Eberhart, E., S. Klugbauer, N. Dimitrijevic, P. R. Jungblut, S. Lamer y H. M. Rabes (2001). "Proteome analysis of rat hepatomas: carcinogen-dependent tumor-associated protein variants." *Electrophoresis* **22**(14): 3009-18.
- Zenri, H., K. Rodriguez-Capote, L. McCaig, L. J. Yao, A. Brackenbury, F. Possmayer, R. Veldhuizen y J. Lewis (2004). "Hyperoxia exposure impairs surfactant function and metabolism." *Crit Care Med* **32**(5): 1155-60.

## *Bibliografía*

- Zhang, L., M. Wang, X. Kang, P. Boontheung, N. Li, A. E. Nel y J. A. Loo (2009a). "Oxidative stress and asthma: proteome analysis of chitinase-like proteins and FIZZ1 in lung tissue and bronchoalveolar lavage fluid." J Proteome Res **8**(4): 1631-8.
- Zhang, S. X., J. J. Miller, D. B. Stolz, L. D. Serpero, W. Zhao, D. Gozal y Y. Wang (2009b). "Type I epithelial cells are the main target of whole-body hypoxic preconditioning in the lung." Am J Respir Cell Mol Biol **40**(3): 332-9.
- Zuo, Y. Y., R. A. Veldhuizen, A. W. Neumann, N. O. Petersen y F. Possmayer (2008). "Current perspectives in pulmonary surfactant--inhibition, enhancement and evaluation." Biochim Biophys Acta **1778**(10): 1947-77.